



HAL
open science

Etudes fonctionnelles de nouveaux prototypes lentiviraux chimériques in cellulo et sur modèles animaux

Laury-Anne Leroy

► **To cite this version:**

Laury-Anne Leroy. Etudes fonctionnelles de nouveaux prototypes lentiviraux chimériques in cellulo et sur modèles animaux. Virologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV027 . tel-03728368

HAL Id: tel-03728368

<https://theses.hal.science/tel-03728368v1>

Submitted on 20 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laury-Anne LEROY

Thèse dirigée par **Yahia CHEBLOUNE**
et codirigée par **François VILLINGER**, University of Louisiana at Lafayette

préparée au sein du **Laboratoire PaVaL - Pathogenèse et Vaccination Lentivirales**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etudes fonctionnelles de nouveaux prototypes lentiviraux chimériques in cellulo et sur modèles animaux

Functional studies of new lentivirus chimeras in cell culture and animal models

Thèse soutenue publiquement le **22 mars 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Yahia CHEBLOUNE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INRAE centre de Lyon-Grenoble
Auvergne Rhône-Alpes, Directeur de thèse

Madame Catherine LEGRAS-LACHUER

MAITRE DE CONFERENCE HDR, Université Lyon 1 - Claude Bernard,
Rapporteuse

Monsieur Giuseppe BERTONI

PROFESSEUR, Universität Bern, Rapporteur

Madame Chantal DUMESTRE-PERARD

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Examinatrice

Monsieur Pascal FENDER

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes, Président

Monsieur Damián DE ANDRES CARA

CHERCHEUR HDR, Universidad de Navarra, Examineur



*À ma maman qui a toujours cru en moi,
Merci pour ton soutien inconditionnel.
Je te dédie cette thèse.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Yahia CHEBLOUNE pour son encadrement, sa bienveillance et sa patience, et pour m'avoir guidée pendant ces années de thèse.

Je remercie également mon co-directeur le Dr. François VILLINGER pour ses conseils et ses encouragements. Merci de m'avoir accueillie dans de si bonnes conditions pour cette aventure américaine, et de votre soutien lors des moments de doutes.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce manuscrit.

Alice et Aditi, collègues et amies qui m'ont aidé dans mes travaux de recherches, toute l'équipe du PAVAL Lab. : Alessandra, Bérénice, Charlotte, Céline, Hibet, Marjo, Sonia, Sarah, Tak, et tous les autres : je suis ravie d'avoir pu être accompagnée par votre bonne humeur au quotidien.

Mes remerciements vont également au Dr. Jean GAGNON pour sa disponibilité, ses conseils et suggestions, et nos discussions scientifiques. Merci au Dr. Corinne RONFORT pour ses remarques et suggestions lors de la rédaction de ce mémoire.

I would also like to thank the members of the New Iberia Research Center, who welcomed me, advised me and shared their knowledge. Thank you to the animal care teams and veterinarians for their advice and their involvement in my thesis work.

Je remercie les membres du comité de suivi de thèse, le Dr. Emmanuel DROUET, Dr. Olivier RENAUDET pour leur bienveillance et leurs conseils avisés.

Thank you to my loving Louisiana family and friends: François, Deepa, Latonia, Ibrahim, Claire, Mariluz, Nihar without whom nothing would have been the same. Thank you for your good mood and all these shared memories. Deepa, thank you for your precious help, your advices and encouragements. Thanks for pushing me when I was not at my best, with lot of kindness. You were this incredible friend, lab-mate and support I needed during those few months. I will miss those moments between Louisiana bayou, shopping and driving sessions, lunch times and nice walks.

J'adresse également mes remerciements aux copains de thèse, Alessandra, Alexandre, Benjamin, Claire, Jonny, Laura, Phoulinh, Romain, Romy, Vianney, Vinicius, Yoann, qui ont rendu cette aventure plus douce. Merci pour ces moments riches en fous-rires, bières, randos et chansons.

Ces remerciements seraient incomplets sans mentionner mes amis et ma famille. Merci pour votre soutien, de près ou de loin, toujours. Merci à toi maman, pour tes encouragements, tes mots rassurants dans les moments de doutes, merci d'avoir toujours cru en moi. C'est à toi que je dédie cette thèse.

Liste des Abréviations	7
------------------------------	---

Chapitre I : Comment le franchissement de barrière d'espèce des lentivirus de primates a mené à la pandémie

I. Les lentivirus	11
1) Virus de l'Immunodéficience Simienne (SIV)	13
a) Histoire naturelle et coévolution des souches	13
b) Infection et pathogénèse chez les primates non-humains	16
2) Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV).....	18
a) Histoire naturelle du virus et découverte de la maladie	19
b) Structure et organisation génomique du HIV-1	22
c) Tropisme et cycle viral	23
d) Cycle du virus	26
3) Latence virale, établissement et maintien d'un réservoir quiescent	29
a) Notions de réservoir	29
b) Latence à long-terme.....	33
c) Sites sanctuaires.....	35
II. Souches virales chimériques SHIV pour l'étude de l'infection par HIV-1.....	39

Chapitre II : Pathogénèse de l'infection par HIV-1.....

I. Evolution clinique et profils de patients.....	42
1) Les stades de l'infection et de la maladie.....	42
a) Primo infection, phase éclipse et aiguë.....	42
b) Phase chronique et phase de latence virale	43
c) La phase SIDA.....	44
2) Profils de patients	45
a) Les progresseurs classiques	45
b) Les progresseurs « rapides ».....	45
c) Patients progresseurs lents et non-progresseurs à long terme et Contrôleurs Elite	45
3) Caractéristiques génétiques et immunologiques des patients « contrôleurs »	46
a) Prédispositions génétiques	46
b) Immunité plus efficace :.....	46
4) Caractéristiques virales identifiées chez les patients « contrôleurs »	47
II. Les défenses de l'hôte contre l'infection	48
1) Les facteurs de restriction cellulaire	49

a)	APOBEC 3G.....	49
b)	TRIM5 α	50
c)	SAMHD1.....	50
d)	BST2	50
2)	Les micro-ARN (miARN)	51
3)	Immunité innée.....	52
4)	Immunité adaptative.....	55
a)	Immunité humorale.....	55
b)	Immunité cellulaire.....	60
c)	Lien entre immunité cellulaire et humorale : activité ADCC.....	68
Chapitre III – Stratégies thérapeutiques et prophylactiques contre HIV-1		70
I.	Mesures thérapeutiques	70
1)	Antirétroviraux.....	70
a)	Les inhibiteurs d'entrée	71
b)	Les inhibiteurs de la rétrotranscription	71
c)	Les inhibiteurs d'intégration	72
d)	Les inhibiteurs de protéase.....	73
2)	Stratégie Kick and kill.....	74
II.	Mesures prophylactiques	75
1)	PrEP	75
2)	La vaccination	76
a)	Les vaccins vivants atténués	77
b)	Les vaccins entiers inactivés.....	78
c)	Les vaccins sous-unitaires protéiques	78
d)	Les vaccins à base de particules vides : Virus-like particule (VLP).....	79
e)	Les vaccins à vecteur viral.....	79
f)	Les vaccins à acide nucléiques	80
3)	Modèles animaux d'étude du HIV	86
a)	Le modèle murin	86
b)	Le modèle Primate Non-Humain.....	89
5)	Essais cliniques.....	92
6)	Les adjuvants utilisés en vaccination.....	94
a)	Les adjuvants à base d'alun	95
b)	Les émulsions	95
c)	Les adjuvants à base de lipides	95

d) Les microparticules de polymères.....	96
III. Les cytokines.....	97
1) Interleukine 7 (IL-7).....	97
2) Interleukine 15 (IL-15).....	98
3) IL-7 et IL-15 en thérapie.....	101
 OBJECTIF DU TRAVAIL.....	 104
Résultats	
Article 1.....	108
Article 2.....	136
 Conclusion générale et perspectives.....	 154
 Annexes.....	 160
Références bibliographiques.....	181

Liste des Abréviations

ADCC : **Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity**
ADN : **Acide DéoxyriboNucléique**
ADNc : **Acide DéoxyriboNucléique Complémentaire**
AGM : Singe vert africain
APOBEC3G : **Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G**
ARN : **Acide RiboNucléique**
ARNm : **Acide RiboNucléique messenger**
ARNt : **Acide RiboNucléique de Transfert**
ARV : **Anti RétroViraux**
BALB/c : **Bagg Albinos**
BCR : **B Cell Receptor**
BHE : **Barrière Hémato-Encéphalique**
BIV : **Bovine Immunodeficiency Virus**
BLT : **Bone marrow Liver Thymus**
bnAbs : **Broadly Neutralizing Antibody**
CA : **Capside**
CAEV : **Caprine Arthritis-Encephalitis lentiVirus**
CCR5 : **C-C Chimiokine Receptor 5**
CD4 : **Cluster de Différenciation 4**
CD8 : **Cluster de Différenciation 8**
CM : **Centrale Mémoires**
CMH : **Complexe Majeur d'Histocompatibilité**
CMV : **CytoMégaloVirus**
CPA : **Cellule Présentatrice d'Antigène**
CRISPR : **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**
CTL : **Lymphocyte T Cytotoxiques**
CXCR4 : **Chemokine C-X-C motif Receptor 4**
DC : **Dendritic Cells**
DC-SIGN : **Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing-Nonintegrin related**
DMEM : **Dulbecco's Modified Eagle Medium**
dNTP : **déoxyriboNucléotides TriPhosphates**
DO : **Densité Optique**
EC : **Elite Controller, contrôleur élite**
EIAV : **Equine Infectious Anemia Virus**
ELISA : **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**
Env : **Enveloppe**
EP : **ElectroPoration**
FBS : **Fetal Bovine Serum**
Fc : **Fragment Cristallisable d'une immunoglobuline**
FIV : **Feline Immunodeficiency Virus**
GALT : **Gut-Associated Lymphoid Tissue**
GFP : **Green Fluorescent Protein**
HAART : **Highly Active Anti-Retroviral Therapy**
HAND : **HIV-Associated Neurocognitive Disorders**

HIV : **V**irus de l'**I**mmunodéficienc**e** **H**umaine
HEK : **H**uman **E**mbyronic **K**idney
HERV: **H**uman **E**ndogenous **R**etro**v**irus
HLA : **H**uman **L**eukocyte **A**ntigen
HRP: **H**orse**R**adish **P**eroxidase
ID : **I**ntra**D**ermal
IFN : **I**nterféron
Ig : **I**mmunoglobuline
IL : **I**nterleukine
IM : **I**ntra**M**usculaire
IN: **I**ntegrase
IRES : **I**nternal **R**ibosomal **E**nt**r**y **S**ite
ISG : **I**nterferon **S**timulating **G**enes
JAK : **J**anus **K**inase
LAV: **L**ympho-adenopathy **A**ssociated **V**irus
LB : **L**ymphocytes **B**
LC : **C**ellules de **L**angerhans
LCR : **L**iquide **C**ephallo-**R**achidien
LN : **N**odule **L**ymphatique
LPS : **L**ipo**P**oly**S**accharide
LT: **L**ymphocytes **T**
LTNP: **L**ong-**T**erm **N**on**P**rogressor
LTR: **L**ong **T**erminal **R**epeat
MA : **M**atrice
miARN : **M**icro **A**RN
MPER: **M**embrane **P**roximal **E**ctodomain **R**egion
MVV: **M**aedi **V**isna **V**irus
Nabs: **N**eutralizing **A**ntibody
NC: **N**uCléocapside
Nef : **N**egative **F**actor
NF-κB : **N**uclear **F**actor of **k**appa light polypeptide gene enhancer in **B**-cell
NK: **N**atural killer
NOD : **N**on-**O**bese **D**iabetic
ORF: **O**pen **R**eading **F**rame
PBMC : **P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells
PBS: **P**hosphate **B**uffered **S**aline
PD-1 : **P**rogrammed-**D**eath 1
pDC : **P**lasmacytoid **D**entritic **C**ells
PFA: **P**ara**F**orm**A**ldéhyde
PHA : **P**hyto**h**emagglutinin **A**
PHPC : **P**recursor with **H**igh **P**roliferation **C**apacity
PNH : **P**rimates **N**on-**H**umains
PR : **P**rotéase
PrEP : **P**rophylaxie de **P**ré-**E**xposition
Rev : **R**egulator of **v**irion expression
RT : **R**everse **T**ranscriptase
SAMHD1 : **S**AM domain and **H**D domain containing protein **1**

SCID : **S**evere **C**ombined **I**mmuno**D**eficiency
SIDA : **S**yndr**o**m**e** d'**I**mmuno**D**éficiency **A**cquise
SHIV : **S**imian **H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus
SIV: **S**imian **I**mmunodeficiency **V**irus
SM : **S**ooty **m**angabey
SNC : **S**ystèm**e** **N**erveux **C**entral
SQ : **S**ous-**C**utané
STAT : **S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription
TAR : **T**rans-**A**ctivating **R**esponse element
Tat : **T**rans-**A**ctivator of **T**ranscription
TB : **T**uberculose
TCID50 : **T**issue **C**ulture **I**nfectious **D**ose **50%**
TCR : **T** **C**ell **R**eceptor
Th : T helper
TMB : **T**etra**M**ethyl**B**enzidine
TNF : **T**umor **N**ecrosis **F**actor
Treg : cellule **T** **r**égulatrice
TRIM5 α : **T**ripartite **M**otif-containing protein **5**, isoform **alpha**
VCC : **V**irus-**C**ontaining **C**ompartment
Vif : **V**irus **I**nfectivity **F**actor
Vpr : **V**iral **p**rotein **R**
Vpu : **V**iral **p**rotein **U**
VSV : **V**esicular **S**tomatitis **V**irus

Introduction bibliographique

I. Les lentivirus

Le genre lentivirus fait partie de la famille des *Retroviridae*, qui regroupe des virus enveloppés d'environ 100 nm, avec un génome composé de deux ARN simple brin à polarité positive de 7 à 12 kb. Les rétrovirus sont ainsi nommés en raison de leur capacité à rétro-transcrire leur ARN génomique en ADN proviral grâce à l'enzyme Transcriptase Inverse ou Reverse Transcriptase (RT). La deuxième particularité de cette famille de virus consiste en leur capacité à intégrer l'ADN double brin rétro-transcrit dans le génome de l'hôte de façon permanente grâce à une deuxième enzyme : l'Intégrase (IN). Leur génome comporte communément trois gènes : le gène *gag*, (antigène de groupe) codant pour une polyprotéine contenant les domaines structuraux de matrice (MA), de la capsid (CA) et de la nucléocapsid (NC) ; le gène *pol*, codant pour les différentes enzymes virales : l'intégrase (IN), la reverse transcriptase (RT), la protéase (PR) permettant le clivage des polyprotéines virales, l'endonucléase et la RNase H ; et enfin le gène *env*, codant pour les glycoprotéines d'enveloppe à la fois de surface (SU) et transmembranaire (TM). L'expression de ces gènes est régulée par les LTR (pour Long Terminal Repeat, séquences terminales répétées) présentes en 5' et en 3' du génome viral. Ces LTR contiennent le promoteur rétroviral et sont composées de trois parties :

- Une région U3, comportant une séquence d'attachement en 5', permettant l'intégration du provirus. Elle est riche en sites de fixation de facteurs de transcription et est sous-divisée en trois domaines en fonction de l'impact des sites de fixation de facteurs de transcription sur l'activité du LTR et sur l'expression des gènes viraux. Le domaine promoteur minimal (nt -78 à -1), qui va générer la transcription basale du virus ; le domaine activateur (nt -105 à -79) composé de deux copies du site de fixation du facteur de transcription inductible NF- κ B ; et le domaine modulateur (nt -453 à -105) qui contient des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription tels que RFB-2 ou NFAT. La fixation de facteurs de transcription dans cette région du LTR sert à moduler l'activité induite par les domaines promoteur minimal et activateur.
- Une région U5 qui précède la séquence *PBS* (pour Primer Binding Site), permettant l'initiation de la reverse transcription après fixation de l'ARNt cellulaire. Des

éléments ayant un rôle dans l'encapsidation sont également présents. On retrouve *Psi* (*Ψ*) packaging element, et *DIS* (dimer initiation site) permettant la dimérisation de l'ARN génomique. En 3' se trouve la deuxième séquence d'attachement *att*. En amont de la séquence U5 de la LTR 3' se trouve la séquence *PPT* (Poly Purine Track) qui permet le saut de la RT et la synthèse du brin d'ADN positif.

Ces deux séquences sont séparées par la région R. Cette région comporte la séquence *TAR* en 5', cible de la protéine Tat virale et permettant la transcription de l'ADNc, alors qu'en 3', on retrouve le site de poly adénylation (PolyA) permettant la fin de la transcription.

Les lentivirus englobent 5 sérogroupes infectant différentes familles de mammifères :

- les équidés (EIAV, Equine Infectious Anemia Virus),
- les bovins (BIV, Bovine Immunodeficiency Virus),
- les petits ruminants (CAEV, Caprine Arthritis-Encephalitis lentiVirus et MVV, Maedi Visna Virus),
- les félins (FIV, Feline Immunodeficiency Virus et PIV, Puma Immunodeficiency Virus)
- les primates (SIV, Simian Immunodeficiency Virus pour les primates non-humains et les virus HIV-1 et HIV-2).

A la différence des autres rétrovirus, les lentivirus ont la particularité d'être karyotropique, c'est-à-dire d'infecter à la fois les cellules quiescentes et celles en division.

Les lentivirus sont ainsi nommés en référence à l'évolution lente de la pathologie, s'étendant généralement entre 10 à 20 ans chez l'homme entre l'infection aiguë, la période de latence clinique apparente plus ou moins longue, et la déclaration de la phase pathologique [1]. En plus des gènes communs à tous les rétrovirus, les lentivirus possèdent des gènes codant les protéines régulatrices et accessoires. Les protéines régulatrices Vif, Tat, Rev et sont synthétisées à partir de l'ARN courts (uni-épissé), et permettent d'accélérer la production des ARN messagers longs viraux. Le gène *vif* facilite l'assemblage des virions et augmente leur infectiosité, *tat* code pour les transactivateurs nécessaires à l'activation de la transcription virale, tandis que *rev* code pour une protéine qui régule l'épissage et l'exportation des transcrits viraux du noyau.

Les gènes accessoires ne sont pas essentiels pour la réplication virale *in vitro*, mais jouent des rôles importants dans la persistance de la réplication virale face aux facteurs de restrictions et réponses cellulaires à l'infection. On retrouve 3-4 gènes accessoires chez les lentivirus :

- *vpr* (et/ou *vpx* chez SIV et HIV-2) permet l'infection des cellules quiescentes comme les macrophages. La protéine résultante est également responsable de la dysfonction de l'immunité en entraînant l'apoptose des cellules proliférant, ainsi que de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2.
- *vpu* joue un rôle dans la libération des virions
- *nef* est requis pour augmenter la capacité de bourgeonnement viral et joue également un rôle dans l'infectiosité et l'activation cellulaire

Au fil des siècles, la coévolution des souches de lentivirus chez les différentes espèces de primates non-humains a mené à leur diversification et à leur adaptation chez les différents hôtes, leur conférant ainsi la capacité de franchir la barrière d'espèce jusqu'à l'homme.

1) Virus de l'Immunodéficience Simienne (SIV)

Des analyses phylogénétiques sont en faveur d'une origine africaine du SIV après la séparation des continents africains et asiatiques. Ainsi, on estime que la première infection aurait eu lieu il y a au moins 32 000 ans, sur l'île Camerounaise de Bioko [2]. Le SIV a été identifié chez un grand nombre d'espèces de primates non-humains africains tels que les mangabeys enfumés (Sooty mangabeys) ou les singes verts africains (African green monkeys). Du fait de cette coévolution du virus avec l'hôte depuis de nombreuses années, l'infection n'entraîne pas d'immunodéficience chez l'hôte naturel dans la majeure partie des cas, bien que la charge virale soit détectable – autour de 10^7 particules par mL de plasma (**Tableau 1**). En revanche, les singes asiatiques, appelés également singes du nouveau monde, ne sont pas considérés comme hôtes naturels du virus.

a) Histoire naturelle et coévolution des souches

En étudiant la génétique des souches virales des différentes espèces de singes africains et des multiples transmissions inter-espèces, il a été possible de retracer l'évolution et les recombinaisons du SIV. Ce virus, présent chez les grands singes comme le chimpanzé ou le gorille a permis le franchissement de barrière d'espèce qui est à l'origine des souches de HIV-

1. De même, le virus présent chez les sooty mangabeys a permis l'émergence du HIV-2 après de nombreuses recombinaisons.

Ainsi, trois souches importantes du SIV pour l'évolution de l'infection chez l'Homme et son adaptation ont été analysées. Basé sur les séquences de différents virus, il n'a été mis en évidence que la recombinaison des souches de *SIV_{mon/-mus/-gsn}* (infectant les singes mona, mustached, et greater spot-nosed, respectivement) et *SIV_{rcm}* (infectant les red-capped mangabeys) pourraient être à l'origine de l'infection des chimpanzés et au développement de la souche correspondante *SIV_{cpz}* [3] (**Figure 1**).

Dans un deuxième temps après une autre transmission inter-espèce indépendante, l'infection des gorilles par les chimpanzés a donné naissance à une nouvelle souche : *SIV_{gor}*. Généralement, les gorilles ne se nourrissent pas de viande et évitent les interactions avec les chimpanzés, mais il est toutefois possible que, par la proche localisation de leurs territoires, des heurts aient éclaté entre les deux espèces, menant au passage de l'infection par le biais de morsures ou de blessures profondes.

Enfin, une troisième souche importante pour l'évolution de la pathogenèse chez l'homme proviendrait du sooty mangabey (*SIV_{smm}*).

Tableau 1 Différences de l'infection par SIV/HIV chez les hôtes naturels ou pathogéniques (d'après [4])

Caractéristiques	Espèce hôte	
	Hôtes naturels – Singes africains (Sooty mangabey et African green)	Hôtes pathogéniques – Humains et Singes asiatiques
Clinique	Rare déplétion des CD4 périphériques Très rare progression vers une phase SIDA Rare transmission verticale Survie 20-30 ans	Déplétion progressive des CD4 Progression vers une phase SIDA, infections opportunistes, encéphalites, néoplasies Transmission verticale commune Immunodéficience et mort de l'individu (singes : 1.5 ans ; humains : 10 ans (médiane))
Virémie	Haute (10^6 – 10^8 particules/mL) (Pic vers 1-2 semaines) puis diminution de la charge virale Charge virale stable	Haute (10^6 – 10^8 particules/mL) (Pic vers 1-2 semaines), puis diminution variable de la charge virale après pic Augmentation de la charge virale au cours du temps
Réponses Immunes	Adaptative Réponses aiguë IFN de type I, puis résolution Milieu anti-inflammatoire Activation et apoptose des cellules T limitée	Adaptative Réponses aiguë IFN de type I, et persistance Milieu pro-inflammatoire

	Préservation des cellules Th17 mucoale Pas de translocation microbienne	Activation généralisée et apoptose significative des cellules T Diminution des cellules Th17 mucoale Translocation microbienne
Cellules cibles	Cellules T CD4 activées (courte durée de vie) - Déplétion précoce des LT CD4 mucoales (phases aiguë), restaurées. - Cellules T CD4 saines chez la plupart des animaux → Déplétion non associée avec SIDA	Cellules T CD4 activées (courte durée de vie) - Déplétion précoce des LT CD4 mucoales - Déplétion progressive des LT CD4 circulantes → associée avec SIDA (<200 cellules/ μ L)

Ces nombreuses adaptations à de nouveaux hôtes ont engendré de nombreuses recombinaisons et modifications dans le génome (**Figure 1**). Ainsi, lors du passage chez le chimpanzé, le gène accessoire *vpx* du *SIVrcm* a été délété, et le gène *vif* tronqué à son extrémité 3' puis reconstruit, entraînant une modification de ses fonctions. Également, la partie 5', incluant *gag* et une partie de *pol*, proviendrait du génome précurseur alors qu'*env* serait apportée par les souches *SIVmon/-mus/-gsn*. Ces changements auront un impact certain dans les mécanismes de résistances intrinsèques propres à chaque espèce. Par exemple, l'incapacité de la protéine Vpr à cibler pour dégrader le facteur de restriction SAMHD1 chez le chimpanzé, contrairement au SIV comportant *vpx*, qui lui confère la capacité d'infecter les cellules myéloïdes et les lymphocytes T quiescents [2]. Également, la protéine Vif du *SIVrcm* qui avait une faible capacité antagoniste pour la protéine APOBEC3G (une cytidine désaminase entraînant des mutations irréversibles dans le génome viral) chez son nouvel hôte chimpanzé, a dû évoluer et est maintenant capable de bloquer ce facteur de restriction (**Figure 1**). L'adaptation du SIV au chimpanzé et la création d'une telle mosaïque aura été un déterminant pour l'adaptation du HIV chez l'homme, permettant de baisser le nombre de barrières d'espèces [5].

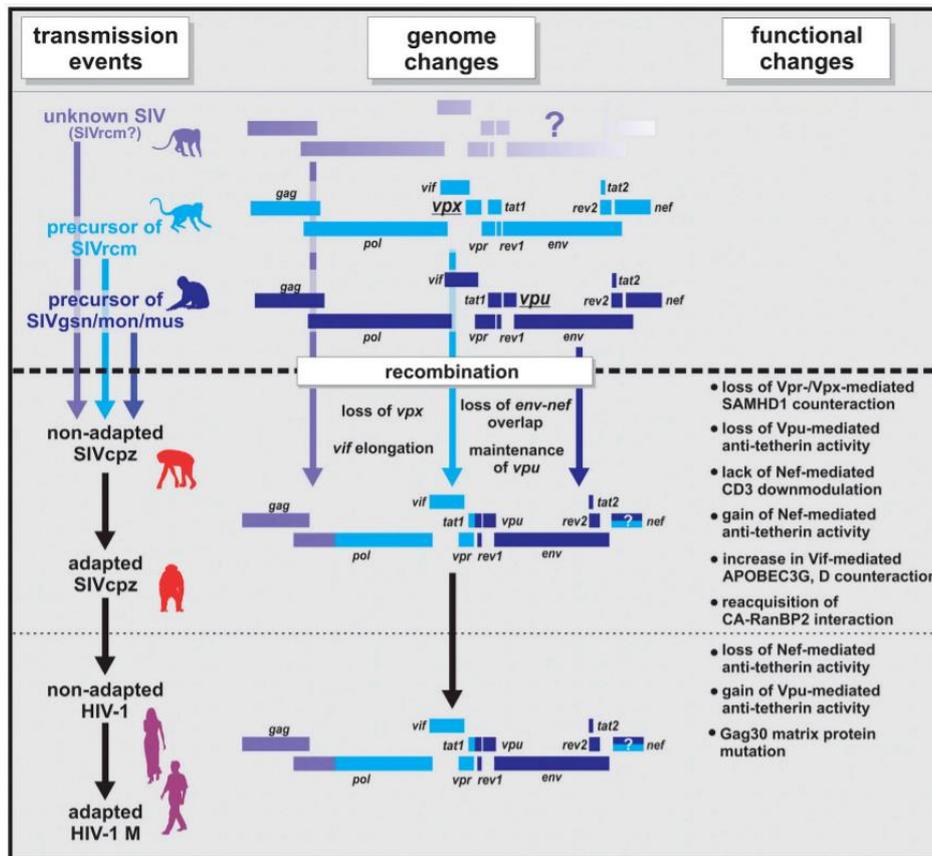


Figure 1 : Evolution et adaptations des souches de SIV/HIV entre les différents hôtes

b) Infection et pathogénèse chez les primates non-humains

Une différence clinique entre les singes africains et asiatique a pu être établie quant au déroulement de l'infection. Dans un premier temps, et communément aux singes africains et asiatiques, un pic de la charge virale apparaît 1 à 2 semaines après infection, atteignant autour de 10^7 copies d'ARNm viral par mL de plasma. Rapidement, une diminution de la charge virale est observée pour les hôtes naturels, suivie par une stabilisation. Ce contrôle rapide de la virémie et l'absence de déficience immunitaire n'est pas clairement expliquée, mais au vu des différences cliniques et des réponses immunitaires établies par les hôtes naturels, plusieurs facteurs sont envisagés pour tenter d'expliquer ces variations.

Dans un premier temps, l'environnement anti-inflammatoire mesuré chez les singes verts africains (AGM) ou les sooty mangabeys (SM) pourrait jouer un rôle. Lors de l'infection expérimentale de macaques par SIV, une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire est observée, entraînant l'activation du système immunitaire, l'augmentation de la prolifération et de l'apoptose des lymphocytes. Cette augmentation de l'inflammation combinée à l'infection massive des cellules T CD4 muco-sales pendant l'infection aiguë

affecte l'intégrité de la barrière gastro-intestinale, entraînant une translocation des produits bactériens (Lipopolysaccharides, ADN bactérien...) dans la circulation générale. Ce phénomène continue d'intensifier cette activation chronique de l'inflammation ainsi que la dérégulation du cycle cellulaire. Chez les SM infectés au contraire, on retrouve des niveaux bien inférieurs d'activation ou de perturbation du cycle cellulaire, mais également une absence de translocation microbienne. Les mécanismes précis sous-jacents à cette résolution de l'activation de la réponse immune sont pour l'instant peu connus. Des théories ont vu le jour, comme un rôle de la régulation rapide de PD-1 ou la diminution d'autres récepteurs associés à la mort cellulaire après infection par SIV ou encore une action précoce des cellules T régulatrices T_{reg} . Ces facteurs jouent un rôle important dans la progression de la maladie.

Un aspect de l'infection reste énigmatique : comment les singes africains parviennent à contrôler la progression de la pathogénèse sans développer de phase SIDA. Ce contrôle s'effectue pourtant avec une augmentation de la virémie lors de l'infection aiguë au même titre que chez les macaques. Cependant, ce contrôle a lieu sans élimination totale puisque la virémie est diminuée mais reste néanmoins stable et détectable.

Il serait aisé d'envisager que la résistance à l'infection chez les hôtes naturels, malgré la maintenance d'une virémie élevée, ne soit pas dû à une réponse immunitaire spécifique particulièrement efficace. Plusieurs études ont entamé la comparaison des hôtes naturels du virus qui ne progressent pas vers un stade SIDA après infection par SIV, aux hôtes pathogéniques. Pendant le stade aiguë de l'infection, le profil des deux types d'hôte est similaire, avec une augmentation importante de la charge virale ainsi que de l'activation de l'immunité, et notamment une régulation à la hausse des gènes responsables de la sécrétion de l'interféron (ISG, pour Interferon Secreting Genes) [4]. La différence s'observe pendant la période de transition entre l'infection aiguë à chronique : alors que chez les hôtes pathogéniques, l'activation immunitaire reste élevée avec de haut taux d'IFN- α plasmatiques, les hôtes naturels montrent une régulation de ce niveau aberrant d'inflammation (AGM, SM) avec une régulation de l'expression d'ISG [6] (**Figure 2**). Egalement, alors que le taux d'apoptose des cellules T CD4 et CD8 était en hausse chez tous les hôtes lors de la phase aiguë (apoptose induite par l'activation cellulaire) et maintenu durant la phase chronique pour les hôtes pathogéniques, il a été observé une résolution chez les hôtes naturels. Une des explications qui pourrait justifier cette résolution serait la capacité de la protéine Nef virale à diminuer l'expression du récepteur CD3 chez les AGM, amoindrissant la susceptibilité à l'apoptose [4]. D'un point de vue immunologique, il n'est pas observé d'augmentation des

protéines pro-apoptotiques PD-1 ou TRAIL chez les SM, contrairement à l'homme. Il a également été montré chez les macaques pig-tailed une plus forte expression de gènes impliqués dans le stress oxydatif, l'apoptose et l'inflammation comparé aux AGM. Cette surexpression a été corrélée avec une prolifération et activation accrue des cellules T CD8 dans le sang et les nodules lymphatiques [7].

Les raisons de cette baisse de l'inflammation chez les hôtes naturels sont encore floues. Il y aurait une augmentation des réponses immunosuppressives par les Treg ainsi qu'une production d'IL-17 via les cellules Th17. Egalement, une réponse immune innée robuste serait mise en place précocément, tout comme le contrôle de facteurs cellulaires ou récepteurs associés à l'activation, l'apoptose ou la fixation du virus [8].

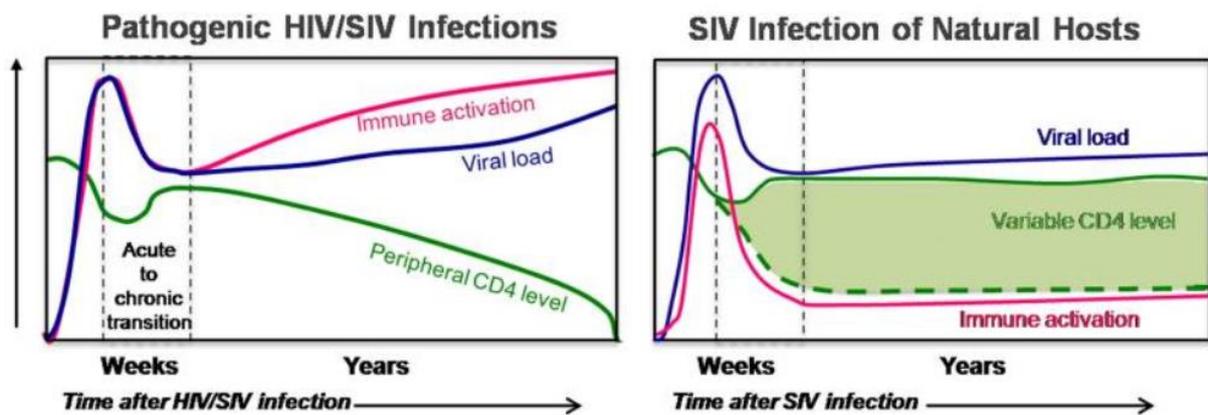


Figure 2 Comparaison de l'infection par HIV/SIV chez les hôtes naturels et pathogéniques (d'après [4])

Chez les SM, il a également été montré une faible expression du corécepteur viral CCR5 à la surface des cellules CD4 centrale mémoire, et une diminution de l'expression du récepteur CD4 chez les AGM. Cette stratégie cellulaire participe à la faible réplication virale dans les CD4, ainsi qu'à la conservation d'un pool de cellule mémoires saines, entraînant *in fine* une faible activation immunitaire en phase chronique ainsi que la conservation de l'homéostasie et des fonctions T helper, important pour l'éviction de la progression de l'infection.

2) Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV)

a) Histoire naturelle du virus et découverte de la maladie

Selon des études phylogénétiques, HIV-1 serait apparu chez l'homme en Afrique dans les années 1920, dans ce qui serait aujourd'hui Kinshasa en République Démocratique du Congo. Cette transmission est due au passage et à l'adaptation du virus de l'immunodéficience simienne (SIV), du singe à l'Homme, qui était chassé et consommé par les autochtones. La théorie la plus probable serait que le virus ait été transmis directement par morsures ou contact des blessures avec le sang infecté. Il s'agirait du point de départ de l'infection. L'amplification de l'épidémie serait due ensuite à l'urbanisation massive de villes suite à l'exploitation par les pays occidentaux, menant à une arrivée massive de travailleurs faisant exploser la prostitution féminine et ainsi la contamination par voie sexuelle. Également, la transmission iatrogène *via* des aiguilles contaminées et réutilisées lors de soins ou de campagnes de lutte contre les maladies tropicales aurait pu favoriser la propagation du virus, et ce à cause des manques de moyens financiers mais également des connaissances sur la transmission des agents infectieux [9].

Le virus SIVcpz, très proche du HIV-1, a été retrouvé chez des chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) en captivité au Gabon. Néanmoins, il n'a pas encore été clairement démontré comment le virus s'est adapté à ces chimpanzés [10]. Plusieurs théories de modèles d'évolution ont depuis été proposées, notamment après de nombreuses transmissions inter-espèces et recombinaisons [2]. Les chimpanzés auraient acquis ce nouveau virus par consommation de viande de singe. Seules les sous-espèces de chimpanzé *Pan t. troglodytes* et *Pan t. schweinfurthii* apparaissent comme infectées, contrairement aux sous-espèces *Pan t. verus*.

Trois axes d'infections indépendants ont été nécessaires pour mener aux actuelles épidémies retrouvées chez l'homme (**Figure 3**).

- Apparition de la pandémie à HIV-1

Après passage du virus chez les grands singes africains, nos plus proches cousins dans le monde animal, puis son adaptation, l'émergence de variants de groupes de plus en plus spécialisés à l'Homme est apparu chez l'humain, et classés en groupes et sous-types en fonction de l'homologie de gènes entre *gag*, *env* et *pol*.

Tout d'abord, lors de la transmission Chimpanzé-Humain, deux premiers groupes distincts ont pu être mis en évidence au sein des HIV-1. Le groupe M, pour *main*, ou majoritaire, regroupant les 9 sous-groupes de virus A, B, C, D, E, F, J et K, et le groupe N (Non-M), plus

rare et localisé au niveau de l'Afrique de l'Ouest. Ces deux groupes comptent pour près de 98% des infections dans le monde. Parmi le groupe M, le sous-type C est le plus représenté au niveau mondial. Il concerne principalement les régions géographiques telles que l'Afrique du Sud et de l'Est, ainsi que l'Asie. Le sous-type B est quant à lui retrouvé en Europe, et en Amérique du Nord [11].

Dans un second temps, après l'apparition du SIV_{gor}, le groupe O (pour Outlier), et dans une moindre mesure, le groupe P du HIV-1 sont apparus chez des individus de l'Afrique de l'Ouest, et chez quelques individus au Cameroun, respectivement (**Figure 3**).

HIV-1 a été officiellement reconnu comme étant un problème de santé en 1981. A cette époque aux Etats-Unis, une recrudescence de cas de sarcomes de Kaposi, une forme rare de cancer, ainsi que d'infections pulmonaires opportunistes chez des hommes homosexuels a éveillé les soupçons. Ces cas étaient premièrement apparentés à l'orientation sexuelle des individus et non à une infection [12]. Un an après, il a été admis que la maladie était d'origine infectieuse, et touchait également les consommateurs d'héroïne et les personnes hémophiles, et a finalement été baptisé SIDA, pour Syndrome de l'Immunodéficience Acquise [13]. C'est en 1983 que le virus a été isolé et identifié par l'équipe des Docteurs Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier de l'Institut Pasteur, et renommé HIV-1 à la place de Lymphadenopathy-Associated Virus, LAV [14].

Rétrospectivement, des analyses ont été faites sur un prélèvement de sang datant de 1959 d'un homme vivant dans l'actuelle ville de Kinshasa, et HIV a été détecté, montrant l'adaptation ancienne du virus chez l'homme [15].

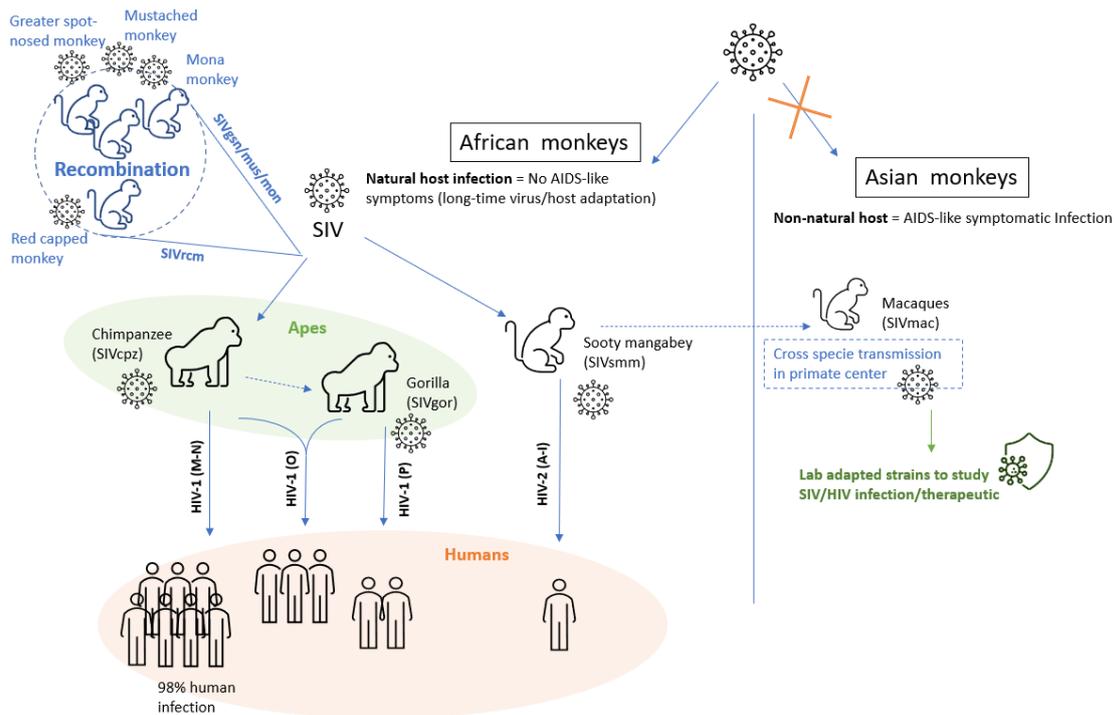


Figure 3 : Origine des différents groupes du HIV et leur transmission à l'homme

- Epidémie due à HIV-2

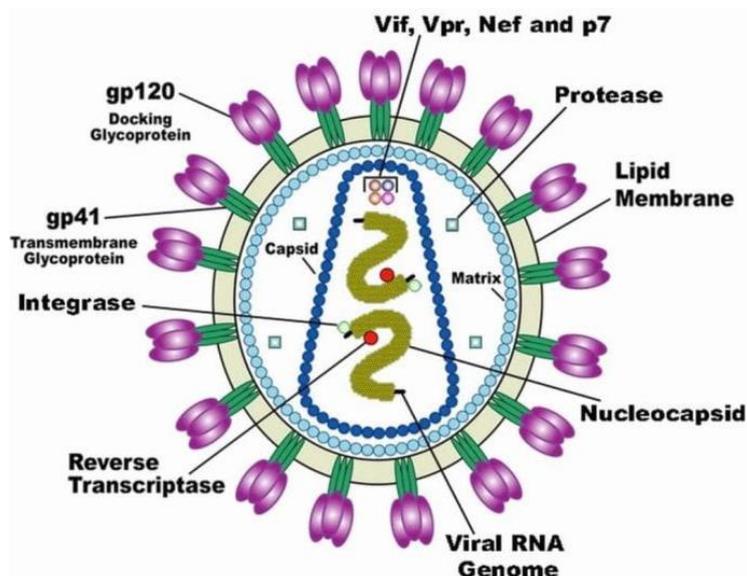
La transmission à l'homme du virus SIVsmm du sooty mangabey a donné naissance à l'épidémie par HIV-2, ayant infecté entre 1 et 3 millions de personnes principalement en Afrique de l'Ouest [16] (**Figure 3**). Il paraît tout à fait surprenant que le SIVsmm ait pu être transmis à l'homme du fait de leur lointaine phylogénie comparée aux grands singes. La théorie la plus plausible serait l'utilisation de ces petits singes comme animaux domestiques par l'homme, ou encore leur chasse pour la consommation de viande de brousse et leur proximité avec l'homme en raison de leur nombre élevé. Également, ces singes affichent une prévalence élevée du virus, multipliant encore le risque de transmission [2]. Cette transmission a mené à la classification en 10 groupes (A, B, C, D, E, F1, F2, G, H, I), où seuls A et B sont endémiques en Afrique de l'Ouest et en Côte d'Ivoire, respectivement, les autres groupes étant des cas d'infection chez des sujets isolés.

Comparativement à HIV-1, le HIV-2 a une virulence atténuée bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement élucidés. HIV-2 aurait une capacité de réplication plus faible que HIV-1 (probablement dû à la distance phylogénétique entre l'homme et le sooty mangabey, comparativement à celle entre l'homme et le chimpanzé). La charge virale plasmatique est 30 fois inférieure au HIV-1, voire indétectable pour 40-70% des cas ; et liée à une meilleure

réponse immunitaire. Également, la transmissibilité du virus, étroitement liée à la virémie, est 5 à 9 fois plus faible pour HIV-2 que pour HIV-1 [16].

b) Structure et organisation génomique du HIV-1

HIV est un virus d'environ 100 nm de diamètre, entouré d'une enveloppe lipidique provenant du bourgeonnement de la cellule hôte infectée. Au sein de cette enveloppe lipidique sont enchâssés des glycoprotéines (gp) virales gp41, auxquelles les gp de surfaces gp120 sont attachées (**Figure 4**). Ces protéines virales jouent un rôle primordial dans l'attachement du virus aux récepteurs des cellules cibles et son internalisation. Elles sont codées par le gène *env* (**Figure 5**). Sous l'enveloppe se trouve assemblées les protéines p17 formant la matrice, puis les protéines de capsid p24 et p6 ainsi que la nucléocapsid p7, toutes codées par le gène *gag* [17]. La nucléocapsid entoure deux copies d'ARN génomique de 9.7 kb, et de sens positif, codant pour 9 gènes fonctionnels répartis dans trois cadres de lecture ouverts. Au sein du virus se trouve également des enzymes, codées par le gène *pol*, comprenant la protéase, l'intégrase, et la transcriptase inverse. Egalement, des protéines accessoires telles que Vpr (Viral protein R), Nef (Negative regulatory factor), et Vpu (Viral protein U), ainsi que les protéines régulatrices Vif (viral infectivity protein), Tat (Transactivator of transcription) et Rev (Regulator of viral protein expression). L'ARNm viral code pour le précurseur polypeptidique Gag-Pol, qui sera clivé par la protéase virale pour produire les protéines Gag et Pol. Un épissage alternatif s'effectue sur d'autres ARNm afin de produire les protéines virales accessoires, régulatrices, ainsi que le précurseur polypeptidique Env. Env sera clivé par les protéases cellulaires pour produire la gp41 et la gp120.



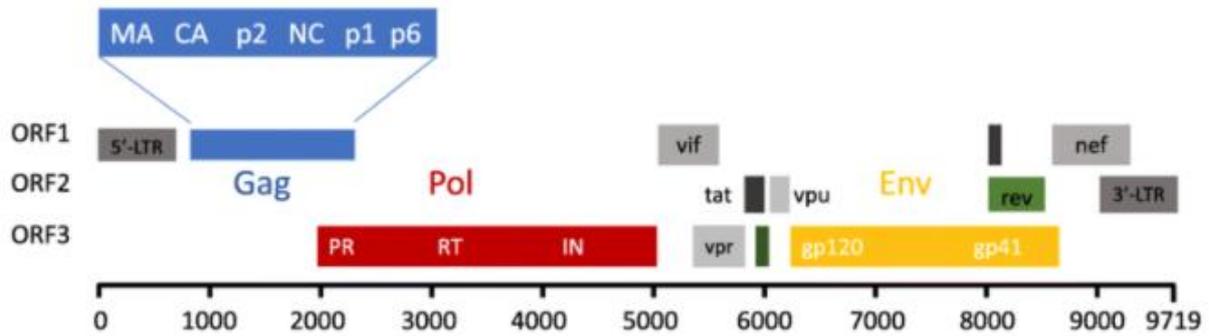


Figure 4 : Représentation de la particule virale du HIV et son génome (d'après [19])

c) Tropisme et cycle viral

Le virus infecte les cellules immunitaires, principalement les lymphocytes T, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Cette infection est rendue possible par la reconnaissance de récepteurs particuliers, exprimés à la surface de ces cellules et essentiels pour l'attachement du virus à sa cellule cible : le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 ou CCR5 [18]. Le corécepteur CCR5 est principalement présent à la surface des monocytes/macrophages et des LT mémoires, tandis que le CXCR4 est présent principalement chez les LT naïfs. Ainsi, il a été admis différents types de tropismes viraux selon leur phénotype, permettant d'identifier la chronologie de l'infection : les souches ayant un tropisme R5, reconnaissant les cellules présentant le CD4 et le CCR5, et qui seront présentes au début de l'infection et constitueront le réservoir du virus. En revanche, les souches ayant un tropisme X4 seront retrouvées plus tardivement, et infecteront principalement les cellules T naïves, menant au stade SIDA par effondrement du système immunitaire [19]. Il existe également des souches capables d'infecter à la fois les cellules présentant le CCR5 et le CXCR4 dites double tropisme, mais aussi certains patients possédant à la fois un mélange de souches avec un tropisme CCR5 et CXCR4 [20]. En règle générale, les souches R5 sont plus aisément transmissibles que les X4, responsables de la grande majorité des infections aiguës mais persistant également lors de formes chroniques. Les souches X4 quant à elles, sont plus sensibles à la pression immunitaire et aux anticorps neutralisants, et seront de ce fait amenées à disparaître par compétition avec une souche R5 [21]. L'émergence de souches X4 (par mutations des régions variables des protéines de la gp120 du virus), apparaît dans 40-60% des cas. Elle entraîne une augmentation du tropisme de cellules cibles, et une accélération de la réplication virale et de la progression de la maladie vers le stade SIDA. En revanche, si le tropisme X4 est une cause ou une conséquence de la

progression de la maladie reste encore controversée. Récemment, une étude a trouvé un lien entre l'activation de l'immunité (notamment avec le marqueur d'activation HLA-DR sur les lymphocytes CD4) et la transition vers un tropisme X4 [22].

Suite à son entrée dans le corps à travers les muqueuses après contact sexuel, HIV-1 va s'attacher tout d'abord aux cellules dendritiques ou aux monocytes/macrophages et s'y répliquer dans les muqueuses. Un a deux jours après l'infection, HIV-1 peut être détecté dans les tissus lymphatiques avoisinant le lieu d'infection, et 5-6 jours post-infection, dans les nodules lymphatiques. Le virus est détecté dans le corps entier dans les 10 à 15 jours post-infection, incluant le système nerveux [17]. Les cellules dendritiques semblent être moins susceptibles à la réplication du virus *in vivo*, mais participent néanmoins efficacement à la dissémination précoce du virus au niveau de la muqueuse génitale et rectale, ainsi qu'au sein des nodules lymphatiques par la séquestration des virions. Dans ce sens, il a été montré que les cellules dendritiques des follicules B avaient cette capacité de transport des virions à leur surface sans être infectées [23]. Un des moyens de contamination le mieux décrit est la transmission des virions d'une cellule infectée à une cellule saine *via* la synapse virologique.

Il a également été décrit que le virus pouvait être séquestré à l'intérieur de vésicules au sein des cellules épithéliales tapissant la muqueuse génitale, intestinale ou orale. Ces cellules sont reliées entre elles par les jonctions serrées de type occludine, claudine-1 ou zonula occludens, et également par des jonctions adhérentes telles que l'E-cadhérine, instaurant ce rôle de barrière [24]. L'entrée du virus dans ces cellules polarisées se fait principalement *via* macropinocytose ou endocytose par des récepteurs secondaires du HIV-1, avant de persister dans les vésicules. Ce phénomène a pu être mis en évidence chez le macaque et sur des lignées cellulaires humaines, où de l'ARN viral a pu être détecté dès 15 min après exposition virale. Bien que l'étape de reverse transcription soit bloquée dans ces cellules, les virions séquestrés restent néanmoins infectieux [25]. Cette exposition à HIV-1 est connue pour induire une disruption de la muqueuse épithéliale par la diminution des jonctions serrées et des jonctions adhérentes menant à la dépolarisation des cellules. Ce mécanisme sous-jacent serait dû à la présence des protéines virales Tat et Gp120 [26]. Cette disruption réduirait la fonction de barrière, ainsi que la dissémination des virus et bactéries de la lumière intestinale vers la muqueuse. Egalement, ce désassemblage pourrait libérer d'autres récepteurs utiles, auparavant inaccessibles aux pathogènes, facilitant l'infection et l'invasion, comme montré pour le papillomavirus humain HPV [27].

De récentes études ont montré que l'interaction de lymphocytes T activés avec les cellules épithéliales contenant les virions infectieux séquestrés dans les vésicules pouvait mener à la diffusion du virus et à l'infection de ces cellules [24].

Aujourd'hui, 1% des européens et 0.3% de la population mondiale porte une délétion homozygote de 32 paires de bases sur le gène CCR5 (CCR5 Δ 32) et si cette délétion permet de ralentir l'infection lorsqu'elle est présente en une seule copie, son absence totale permet une résistance à l'infection par le HIV-1. Cette mutation crée un codon stop, et empêche ainsi la formation de la boucle 2D7 nécessaire à la fixation du HIV-1. Selon une étude de l'université de Liverpool utilisant des modélisations mathématiques, cette mutation serait venue entre le XII^{ème} et le XV^{ème} siècle à la suite d'épidémies de fièvre hémorragique en Europe, entraînant une pression de sélection par l'utilisation du récepteur CCR5 [28]. Ainsi, cette particularité génétique est absente chez les populations asiatiques et africaines.

Cette mutation a également entraîné une grande attention chez la communauté scientifique pour la lutte contre l'infection depuis les cas de rémission observés chez les patients dits « de Berlin » et plus récemment le patient « de Londres ». Ces deux cas sont les seules observations de guérison spontanées observées à ce jour.

L'Américain Timothy Ray Brown, le patient de Berlin en référence à la ville où il a été soigné, a été diagnostiqué HIV-1 positif en 1995 et placé sous ART. En 2007, à la suite d'une leucémie myéloïde, ce patient a été totalement irradié puis transplanté deux fois avec des cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT) provenant de moelle osseuse d'un donneur portant la mutation homozygote CCR5 Δ 32. Il n'avait plus montré de signe d'infection pendant plus d'une dizaine d'années, même après arrêt du traitement antirétroviral, et présentait une charge virale indétectable 600 jours plus tard. Également, le taux d'anticorps spécifique au virus avait chuté, signe d'une diminution importante de la charge virale [29]. Il s'agissait du premier patient à être guéri du HIV-1. Plus récemment en 2019, la communauté scientifique annonçait la suppression du virus à long terme du patient de Londres - Adam Castillejo, infecté par HIV-1 depuis 2003. Ce contrôle faisait suite à une transplantation de moelle osseuse en traitement de son lymphome. Tout comme pour le patient de Berlin, le donneur portait la double mutation CCR5 Δ 32. En revanche, ce patient avait reçu une seule transplantation, et une irradiation partielle de son système immunitaire [30]. En 2020, après 3,5 ans sans antirétroviraux, aucun ARN plasmatique (< 1 copies/mL) ou dans le sperme (< 12 copies/mL), et aucun virus n'a été décelé dans le liquide céphalo-rachidien. Aucun ADN viral n'a été retrouvé dans les échantillons de biopsies intestinales.

Ces résultats extrêmement encourageants ont conduit au questionnement d'une thérapie liée à la répression du CCR5. Mais bien que prometteuse et historique, il reste important de souligner que la stratégie d'irradiation et de transplantation a été expérimentée sur d'autres patients infectés par HIV-1 et s'est soldée par un échec et que le nombre de donneurs potentiels est très limité. De plus, cette thérapie est mortelle dans un tiers des cas, et comme rapporté par Timothy Brown, il s'agit d'une procédure longue et très difficile à supporter.

d) Cycle du virus

Après contact étroit avec des fluides corporels infectés, le virus va très rapidement pénétrer dans les cellules et se multiplier. Il est largement assumé que la voie sexuelle soit le principal mode de transmission, bien que la probabilité soit relativement faible, avec des taux compris entre 0.0001 à 0.0040 [31]. La première étape du cycle viral débute par l'attachement de virus à la cellule, suivi de son entrée. Plusieurs étapes sont nécessaires, impliquant des interactions électrostatiques et des changements conformationnels (**Figure 5**). Tout d'abord, la reconnaissance et l'attachement au récepteur CD4 de la cellule cible (chargé négativement) par la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du HIV-1 (chargée positivement), va entraîner un premier changement conformationnel et libérer la protéine transmembranaire gp41, jusque-là inaccessible. La Gp120 présente un haut degré de variabilité génétique, comprenant 5 domaines variables (V1-V5) et 5 domaines constants (C1-C5) en fonction des variations de séquences d'acides aminés. La fixation au CCR5 ou CXCR4 va dépendre de cette séquence d'acide aminés de la gp120, et plus particulièrement des régions variables V1-V2 et V3 [32].

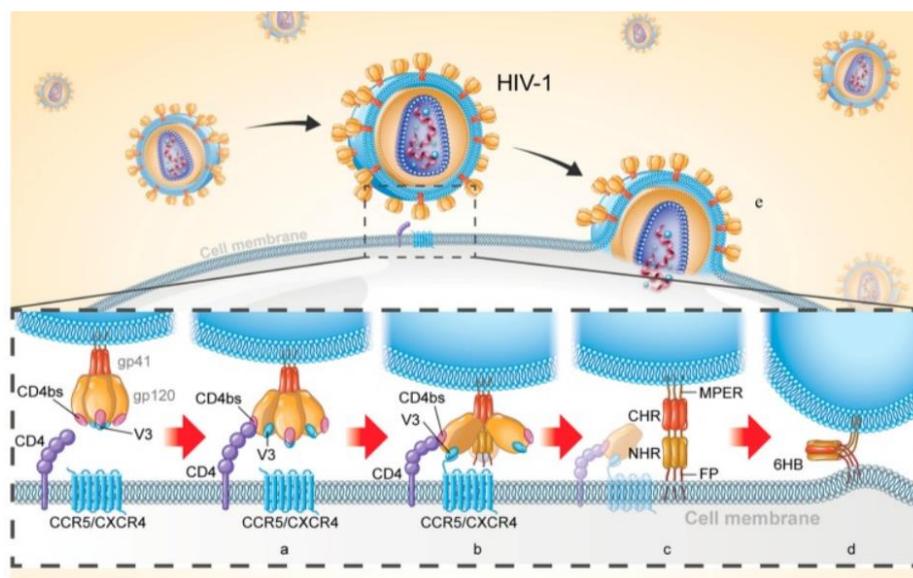


Figure 5: Interaction du HIV-1 avec les cellules cibles pour l'initiation de l'entrée (d'après [33])

La fixation de la gp41 virale avec le corécepteur cellulaire CCR5 ou CXCR4 amorce le début du cycle d'entrée dans la cellule, grâce à un second changement de conformation menant à la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane cellulaire. Dans le cytoplasme, la nucléocapside est démantelée et libère l'ARN viral. Grâce à l'enzyme RT, l'ARN est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). Tout d'abord, la synthèse du brin négatif de l'ADNc à partir de l'ARN viral, puis du brin d'ADN positif à partir de celui négatif. Cet ADNc double brin est ensuite transporté dans le noyau de la cellule par le complexe de pré-intégration (PIC). Une fois dans le noyau, l'enzyme virale IN associée à l'ADNc va assurer l'insertion de cet ADN proviral dans le génome de la cellule infectée, de préférence à un endroit transcriptionnellement actif et non enrobé d'histones. Cette insertion résulte en une transcription majeure de copies d'ARN viraux. Ainsi, trois types d'ARN vont être produits [34] :

- Les ARNm génomiques (mRNAg – 9 kb), qui seront encapsidés dans les nouveaux virions relargués. Ils vont coder pour les protéines Gag et Gag-Pol.
- Les ARN partiellement épissés (mRNAss, pour single spliced – 4 kb), codant pour les protéines d'enveloppe Env Gp160, ainsi que Vif, Vpr et Vpu
- Les ARN entièrement épissés (mRNAds, pour doubly spliced – 2 kb), permettant la synthèse de Nef, Tat et Rev. Ces protéines nouvellement synthétisées vont jouer un rôle dans les étapes plus tardives : Tat va permettre la suractivation de la transcription du provirus, tandis que Rev va entraîner une gêne allostérique et ainsi bloquer l'épissage des ARNm pour leur transport vers le cytoplasme pour l'encapsidation en tant qu'ARN génomique (**Figure 6**).

Les différents ARNm vont être décodés et traduits par les ribosomes et les protéines résultantes vont être transportées à la surface de la cellule. Avant l'amorçage de l'assemblage, certaines protéines telles que Gag ou gp160 vont subir des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations, ou des phosphorylations. Le complexe d'assemblage est composé de Gag-Pol, Gag, gp160 et de l'ARN génomique formant le pré-virion. Cet assemblage de protéines va permettre le bourgeonnement et les virions résultants seront de ce fait composés de la membrane de la cellule infectée comportant les glycoprotéines virales enchâssées. Une fois à l'extérieur de la cellule, ces virions vont continuer leur maturation avant de pouvoir infecter de nouvelles cellules cibles [35].

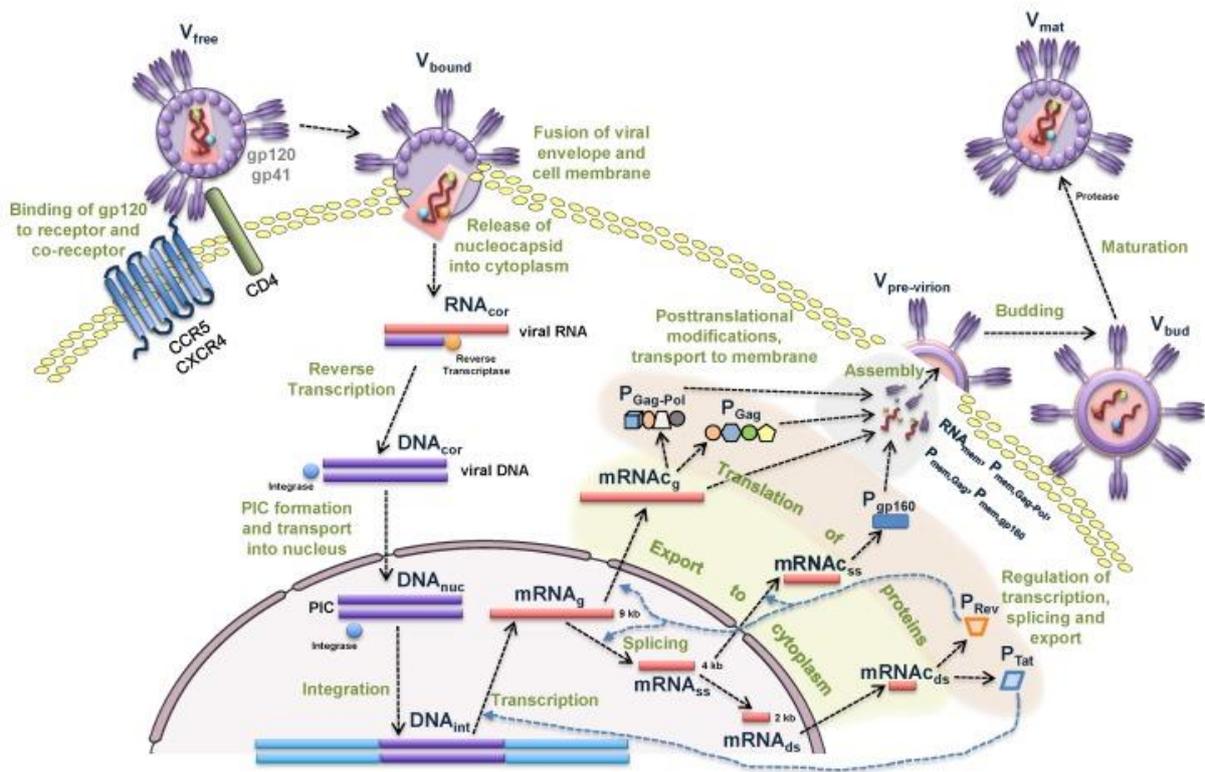


Figure 6: Cycle de répliation du HIV-1 [37]

3) Latence virale, établissement et maintien d'un réservoir quiescent

a) Notions de réservoir

L'établissement du réservoir viral est toujours étudié à ce jour. Il se met en place dans les premiers jours après l'infection, et possiblement avant même la circulation du virus dans le sang.

La mise en place du réservoir viral est initiée lors de l'insertion de l'ADN proviral au sein du génome des cellules infectées. Il s'agit alors d'un type cellulaire (majoritairement les lymphocytes CD4 activés ainsi que les monocytes/macrophages tissulaires et les DC) ou d'un compartiment au sein duquel le virus persiste et est capable de réplication une fois réactivé. Ces compartiments anatomiques peuvent être également caractérisés comme des sites sanctuaires, où le virus peut se répliquer à bas bruit du à la faible pénétration des ARV, ou à des propriétés biologiques propres à ces sites (organes immuno-privilegiés avec faible accessibilité du système immunitaire...)

Néanmoins, l'endroit de l'insertion ne se fait pas au hasard, et aura une place importante dans ce processus. Alors que la communauté scientifique concevait que cette insertion était opérée dans les régions de l'hétérochromatine, régions des gènes dits silencieux, cette preuve a été réfutée par la suite après réalisation d'un criblage PCR inverse des cellules T CD4+. Cette étude a été réalisée sur 16 patients, montrant que 93% des événements d'intégrations se trouvaient localisés dans les introns de gènes activement transcrits de l'euchromatine [36, 37]. Il aurait été montré que cette intégration de l'ADN proviral était opérée grâce au facteur cellulaire LEDGF/p75, quel que soit l'état de réplication (active ou non) du virus. En revanche, le recrutement de deux autres protéines : Iws1 et Spt6, ainsi que leur association mena à la répression de la réplication et donc à la latence [38].

De façon intéressante, il semblerait que les facteurs cellulaires ne soient pas les seuls mis en cause dans l'état de latence et de réactivation virale. En effet, une théorie indiquerait que des mutations aléatoires dans le gène *tat* pourraient empêcher la transcription de HIV-1 et ainsi influencer la latence virale indépendamment de l'état d'activation de la cellule. Une étude *in vivo* a d'ailleurs appuyé cette théorie en inhibant les stimuli d'activation dans l'environnement des cellules T CD4+ infectées par le virus. Il s'en est suivi une diminution attendue de l'état d'activation des cellules mais en revanche, l'activité de la transcription virale restait inchangée. Également dans cette même étude, la reconstitution d'un signal positif de Tat a été

démontré suffisant pour contrôler la transcription virale sans activation cellulaire, qualifiant le circuit viral d'autonome pour le contrôle de la latence [39]

Seuls quelques provirus sont capables de réémergence à partir de cellules latentes infectées, notamment dû à des erreurs intervenues lors de l'intégration au génome de la cellule hôte (délétion, insertion ou mutations de bases, menant à un provirus défectif). Les provirus présents dans les cellules T CD4+ infectées peuvent être subdivisés en 3 catégories [40]:
a) les provirus intacts inductibles : qui peuvent mener à la réplication virale suite à une simple stimulation. Ils comptent pour environ 1% des provirus.

b) les provirus intacts non-inductibles : provirus intacts qui ne sont pas réactivés par une simple stimulation, mais qui peuvent l'être par plusieurs stimulations subséquentes. Il s'agit d'environ 12% des provirus.

c) Enfin, les provirus défectifs, qui ne permettent pas la production de virus infectieux du à des mutations ou délétions dans le génome. Cette dernière catégorie représente près de 88% des provirus. Malgré cette incapacité de production, les cadres de lectures ouverts (ORF, pour Open Reading Frame) pour les différentes protéines virales peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse. Egalement, certains événements comme les recombinaisons ou les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent entraîner la production *de novo* de protéines virales [41].

Lors de l'infection des macrophages par HIV-1, la production de virions et leur assemblage se déroule à l'intérieur de compartiments spécifiques contenant le virus (virus-containing compartments, VCCs) conférant aux virions une protection et retient leur potentiel infectieux pour une période étendue [42]. Une des caractéristiques des macrophages face à HIV-1 est leur capacité à transporter le virus qui les infecte seul ou contenu dans des cellules T CD4 infectées phagocytées [43]. Cette dernière particularité aurait pour conséquence d'augmenter la probabilité d'infection des macrophages ainsi que l'établissement de la latence [44]. De plus, ces cellules résistent aux effets cytopathiques induits habituellement par l'infection virale, ainsi qu'à l'élimination par les cellules T cytotoxiques et à certains traitements antiviraux [45]. Ainsi, ce dernier point est important à prendre en considération puisqu'il pourrait participer à la maintenance d'une réplication virale sous ART et à la maintenance du réservoir. Il est maintenant de plus en plus documenté que les macrophages des tissus résidants peuvent jouer un rôle dans l'élaboration d'un réservoir latent à long terme tout d'abord par leur durée de vie longue, mais également grâce à leur capacité à intégrer l'ADN proviral lors de l'infection, tout comme les cellules de la microglie et les astrocytes du

système nerveux central (SNC). Leur capacité d'auto-renouvellement et leur longue capacité de survie dans les tissus résidents peuvent également leur conférer cette capacité de maintenir le réservoir viral [42].

Ces cellules infectées par les souches de HIV R5-tropiques sont généralement retrouvées dans les muqueuses. Une récente étude a d'ailleurs démontré que les macrophages localisés dans les tissus urétraux de patients HIV+ sous ART contenaient de l'ADN viral intégré, de l'ARN, des protéines et également des virions intacts dans ces VCCs, bien que tous ces composants soient indétectables dans les cellules T urétrales après réactivation [42]. Des études précédentes ont montré que le génome de HIV-1, tout comme la proportion de virus nouvellement produits après interruption de traitement, venait d'un réservoir de cellules différent des cellules T. Les macrophages étaient donc fortement suspects d'être responsables de cette émergence. En effet, ils sont en première ligne d'une transmission sexuelle par HIV-1 dans les muqueuses. Egalement chez la souris, un modèle humanisé avec des cellules myéloïdes (MoM, pour Myeloid-only mice) infectées par HIV-1 a montré un rebond viral chez 33% d'entre elles 7 semaines après interruption du traitement antirétroviral, montrant une fois de plus l'implication des macrophages dans l'entretien d'un réservoir viral [41].

Un autre type de cellules provenant de la lignée myéloïde, les cellules dendritiques DC, sont susceptibles à l'infection par HIV-1 et ainsi peuvent être responsables de l'établissement du réservoir et de la propagation virale. En effet, le virus peut utiliser ces cellules comme cheval de Troie, le menant aux nodules lymphatiques riches en cellules cibles, et facilement infectables par les synapses virologiques. Parmi les différents sous-types de DC, tous sont susceptibles mais inefficaces à la réplication virale. En effet, il a été montré que l'efficacité d'infection par HIV-1 des DC *in vivo* était 10 à 100 fois plus rare que celle des cellules T CD4+ [46]. Il a été suggéré que les DC folliculaires étaient le sous-type majeur pour la contribution du réservoir HIV-1 [44].

Bien que l'infection cellule-à-cellule entre les LT soit un facteur critique pour la persistance du réservoir viral sous ART, il a été montré *in vitro* que l'infection en *trans via* les CPA telles que les DC ou les macrophages résulte en une réplication virale bien plus importante, et également plus importante que l'infection directe en *cis* des LT [47] (**Figure 7**).

Les DC possèdent à leur surface le récepteur CD4, rendant possible l'infection conventionnelle par HIV-1, le CD169, ainsi que la molécule DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin), responsable de la reconnaissance et

la capture de HIV-1 par les DC mais également de la présentation antigénique ainsi que de leur *trans*-infection. Ce récepteur DC-SIGN, hautement exprimé à la surface des DC, reconnaît certains sucres comme le mannose ou le fucose, très présents à la surface du HIV-1 par la présence de gp120 [46]. Après endocytose, le virus peut rester présent jusqu'à 24h à l'intérieur des DC, puis être dégradé ensuite par la fusion avec les lysosomes. Il est décrit que les DC mettent en général entre 12 et 24h pour migrer vers les nodules lymphatiques, d'où cette hypothèse de « cheval de Troie ». Deux mécanismes sont envisageables pour la *trans*-infection :

Le virus peut être transmis *via* la synapse virologique mise en place lors de l'interaction avec les LT, et ainsi infecter ces cellules qui seront activées par l'interaction avec la CPA (**Figure 7a**, gauche). Il a été montré dans une étude que le récepteur DC-SIGN était essentiel pour la transmission du virus lors de la formation de la synapse virologique [46]. Ainsi, si ce récepteur était délété, la transmission du HIV-1 devenait inefficace. Cette méthode de transmission est indépendante du CMH, et est également insensible à la présence d'antiviraux comme la trithérapie ou la PrEP, permettant l'expansion du réservoir à bas bruit et la latence virale.

Le virus peut également être transmis contenu dans des exosomes, et infecter les LT avoisinants après fusion à la membrane. Ce moyen de transmission exosome-LT est 10 fois plus infectieux que celui des LT par un virus libre. De plus, les exosomes contiennent des facteurs améliorant l'infection telles que des molécules du CHM-II, activatrices des LT, ainsi que des molécules de liaison [46] (**Figure 7a**, droite). D'autres cellules peuvent être impliquées, comme les mastocytes.

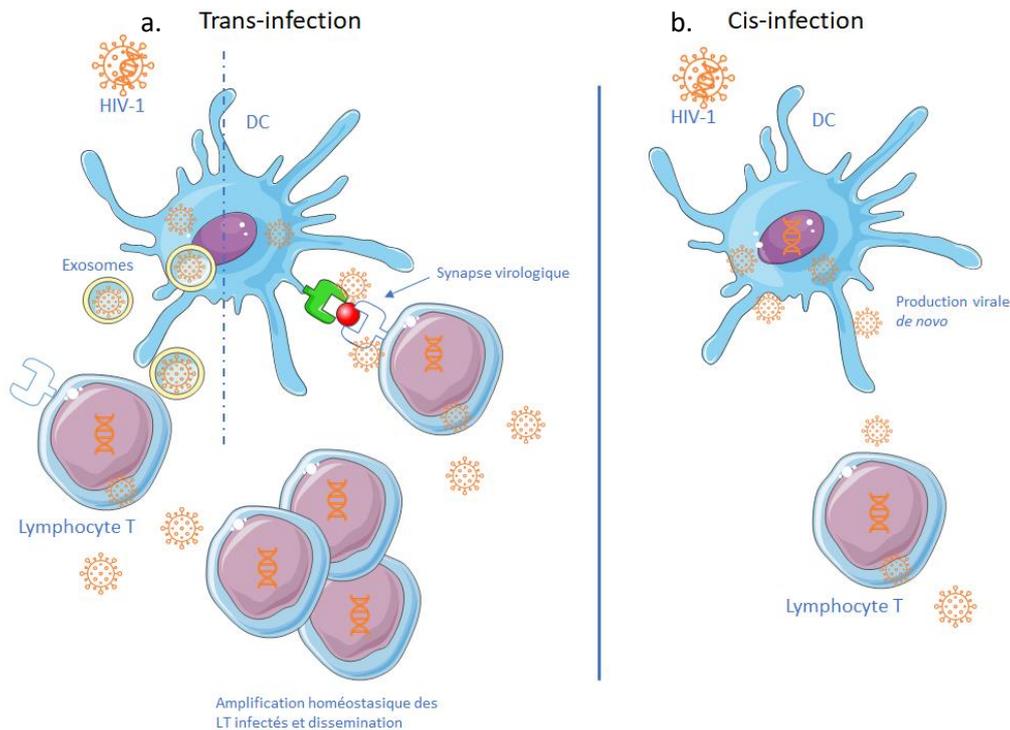


Figure 7 : Implication des Cellules Dendritiques dans l'infection par HIV-1 et le maintien du réservoir viral

Les cellules hôtes dont le génome a été intégré par l'ADN proviral vont proliférer soit de façon homéostatique, soit par la stimulation d'un antigène spécifique. Une fois réactivées, les cellules contenant le provirus intact vont produire et libérer les virions. Ces derniers vont constituer le pool de virus capable de se répliquer, puis mener au rebond viral en cas d'interruption du traitement antirétroviral. En revanche, lors de l'activation des cellules infectées contenant un provirus défectif, les cellules vont être incapables de produire des virions, mais vont pouvoir produire des protéines et de l'ARN viral associé aux cellules, menant à l'activation de la réponse immunitaire. Il est possible que cette activation constante du système immunitaire, à la fois par la production active ainsi qu'annexe de virus participe à l'épuisement de celui-ci. Sans activation, les provirus défectifs ou intacts contenus dans les cellules restent sous forme latents [48].

b) Latence à long-terme

Les principales cellules responsables du maintien de ce réservoir sont les lymphocytes T CD4 mémoires résidant le plus souvent dans les nodules lymphatiques secondaires, les cellules de la rate, ou des muqueuses intestinales dans le génome desquelles le virus s'est intégré. Ces

cellules mémoires ont une durée de vie étendue comparé aux cellules effectrices plus différenciées. Il a été montré que la demi-vie de ce réservoir latent est extrêmement longue (44 mois), ce qui nécessiterait théoriquement plus de 60 ans de traitement pour atteindre sa complète éradication [49].

Il existe deux états différents de latence virale : on retrouve le modèle de latence dit de pré-activation, qui s'établit lorsque le virus infecte une cellule T en état de repos (cellule T naïve, non-activée). Ce modèle est cliniquement peu important pour la persistance à long terme du virus, dû principalement aux restrictions en différents points du cycle viral, ainsi qu'à la non-intégration de l'ADN proviral, suivi de sa dégradation [50]. La demi-vie du complexe de pré-intégration (PIC) estimé entre 1-6 jours, contribuerait également à la diminution de la capacité d'intégration dans ce cas.

Le deuxième modèle de latence est dit post-activation. Ainsi, les cellules T CD4 activées vont être infectées par le virus, et l'ADN viral va être intégré dans le génome de la cellule hôte. Après activation, une petite fraction des cellules T CD4+ vont revenir à l'état de repos, exerçant leur potentiel de cellules mémoires et contribuant à la création d'un réservoir de cellules latentes à longue durée de vie.

Les conditions optimales pour que l'infection soit amorcée sont dépendantes de l'activation des cellules T, surexprimant ainsi le co-récepteur CCR5. Dans cet état, l'entrée et l'intégration du virus seront exécutées, mais lorsque que les cellules retourneront vers un phénotype mémoire après la phase de contraction, l'expression du provirus sera transitoire. L'expression ne permettra pas le développement des effets cytopathiques de la cellule et son apoptose, facilitant ainsi la latence virale à long terme. Egalement, les protéines virales n'étant pas exprimées, les cellules infectées seront indiscernables des autres cellules non-infectées et donc pas détectées ni éliminées par le système immunitaire.

Le réservoir est caractérisé comme latent lorsque les cellules infectées ne sont pas dans un état activé et ainsi, ne produisent pas d'éléments viraux. La réactivation des cellules quiescentes infectées lors de l'interruption du traitement ARV mènera de nouveau à la libération de nouveaux virions, entraînant le rebond de virémie chez les sujets infectés.

Différents paramètres peuvent justifier l'établissement de cet état de latence sur le long terme [44] :

- L'intégration des provirus compétents pour la réplication dans des cellules à longue durée de vie
- La présence de tissus sanctuaires, ou sites immunitaires privilégiés, avec une pénétration faible des ARV tels que le GALT ou le SNC, favorisant le maintien d'une virémie résiduelle
- La dissémination du virus de cellules en cellules, avec un niveau de réplication viral très faible
- La prolifération homéostatique des cellules latentes infectées
- L'activation spontanée des cellules T CD4 quiescentes infectés pendant la trithérapie, résultant en la multiplication intermittente du virus

c) Sites sanctuaires

Un sanctuaire viral est un site anatomique (tel que le cerveau) ou cellulaire (par exemple les lymphocytes T quiescents infectés de façon latente) imperméable à l'action d'une ou plusieurs drogues antivirales et au sein duquel le virus se réplique ou persiste en dépit du traitement. Ces sanctuaires sont appelés des réservoirs viraux lorsqu'ils réalimentent l'organisme en virus.

Deux types de réservoirs sont décrits : le réservoir cellulaire (lymphocytes T CD4+, macrophages, DC...) et les réservoirs anatomiques, tels que les nodules lymphatiques, le cerveau, la moelle osseuse, le tractus génital, et le tissu lymphoïde associé à l'intestin. Certains de ces réservoirs sont caractérisés comme étant des sites sanctuaires, présentant une pénétration faible ou incomplète aux drogues (par exemple par la présence de barrières comme la barrière hémato-encéphalique – BHE dans le cerveau), ou une immunosurveillance contrôlée, menant à la persistance ou à la sélection de souches virales résistantes.

- **Cerveau**

Avec la présence de la barrière hémato-encéphalique, le cerveau est un organe isolé et protégé de la pénétration de certains agents chimiques telles que les drogues [51]. Cette particularité permet au HIV-1 de pouvoir se répliquer faiblement, et d'établir sa latence au sein de cellules permissives. Les CPA professionnelles telles que les macrophages ou DC infectés sont connues pour augmenter la transmission virale *via* les synapses virologiques mises en place. Or, ces CPA sont en association avec les astrocytes dans le cerveau, et pourrait faciliter la transmission ainsi que l'établissement de la latence virale à long terme dans ces sites sanctuaires [44].

Le virus est détecté dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) tôt après l'infection, ce qui fait du cerveau un site sanctuaire potentiel. Or cette présence augmente considérablement le risque de développement de désordres neurocognitifs (HAND, pour HIV Associated Neurocognitive Disorders) par l'inflammation et la sécrétion de neurotoxines endommageant les cellules cérébrales.

Il est peu aisé d'étudier ce site anatomique humain pour des raisons évidentes d'accès, néanmoins, l'étude de cerveaux *ex vivo* de macaques infectés ou provenant d'autopsies humaines, ainsi que de LCR humain a permis d'identifier des types cellulaires potentiellement responsables du maintien de ce réservoir. Par exemple, il a été démontré une compartimentation du virus chez les patients souffrant de démence, avec des populations virales distinctes impliquant une réplication indépendante du virus dans le SNC, ainsi qu'une amplification clonale du HIV-1 dans le SNC comparé au compartiment sanguin [41]. Après investigation, les souches virales présentes étaient majoritairement macrophages-tropiques. De façon intéressante, cette compartimentation n'a pas pu être mise en évidence chez les sujets ne souffrant pas de HAND, où un équilibre a été retrouvé entre les souches dans le compartiment sanguin et le SNC [52].

Encore aujourd'hui, il n'est pas établi avec certitude quelles cellules étaient responsables de cette compartimentation dans le SNC. Certains travaux de recherches avaient émis l'hypothèse que les cellules de la microglie, ainsi que les astrocytes pouvaient être responsables du réservoir viral dans le SNC. Ce type cellulaire est le plus abondamment infecté et leur demi-vie relativement élevée [53]. Même si des études plus récentes ont contredit cette supposition pour les astrocytes chez des sujets sous ART, en montrant que ces cellules ne comportaient pas d'ADN viral et ne produisaient pas de virus, par conséquent, elles ne pouvaient être un réel réservoir viral [54]. Une équipe américaine ayant développé un modèle de souris humanisées avec des astrocytes et des PBMCs, démontrant que l'infection des astrocytes pouvait être productive pour HIV-1 *in vivo*. Également, le trafic du virus s'effectue entre le cerveau et la périphérie, impliquant une évolution constante des souches virales et leur réimplantation en périphérie [55].

En revanche, l'ADN du HIV-1 a été retrouvé dans des macrophages et des cellules microgliales. Les macrophages ont une demi-vie exprimée en mois, ne se divisent pas mais peuvent être renouvelés dans le SNC par des monocytes traversant la BHE. Le passage de monocytes infectés ou transportant le virus peut être une source d'apport de virus dans ce compartiment. Les cellules microgliales sont une population cellulaire très stable puisque leur

demi-vie est comptée en années. Elles sont capables de division cellulaire et sont hautement susceptibles à l'infection par le HIV-1. Elles constituent donc un candidat privilégié pour l'établissement d'un réservoir principal du virus [53]. Elles sont aussi responsables de la dissémination et l'établissement de pathologies neurodégénératives par le relargage de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) et de molécules neurotoxiques (glutamate ou protéines virales excrétées gp120, tat, nef) [56].

- **Tractus reproducteur masculin**

Il est maintenant établi que le sperme est le premier vecteur de contamination du HIV-1, avec une efficacité supérieure d'infection de l'homme à la femme ou d'homme à homme, que de femme à homme. En revanche, l'affirmation que le tractus reproducteur soit un réservoir sanctuaire du virus ainsi que l'origine des cellules les contenant est encore controversé en partie du à la faible accessibilité aux organes reproducteurs de patients séropositifs. Les souches des particules virales libres retrouvées dans le sperme sont différentes de celles produites par les cellules immunitaires spermatiques des patients infectés. Elles sont aussi différentes de celles émises par les leucocytes du sang périphériques. Ces observations ont conduit à l'hypothèse en faveur d'une infection productive de plusieurs des organes qui participent à la production du sperme [57]. Le liquide séminal étant produit approximativement à 60% par la vésicule séminale et à 30% par la prostate, il serait logique de penser que ces organes seraient la principale source virale du sperme. Le passage du liquide séminal au contact de l'épithélium sécrétoire peut également enrichir celui-ci de particules virales dans le liquide séminal, mais aussi transporter des cellules infectées se détachant lors de l'éjaculation [58].

Il a aussi été démontré que les spermatozoïdes sont dépourvus du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 et ainsi ne seraient pas permissifs à l'infection par HIV-1. En revanche, la présence de molécules de galactosylceramide à leur surface sur lesquelles se fixeraient la gp120 du HIV-1, pourrait permettre la fixation du virus et son transport [59].

Les testicules pourraient également jouer un rôle dans l'établissement du réservoir viral : on sait maintenant que la barrière hémato-testiculaire, ainsi que les glycoprotéines P (P-gp) qui la composent limitent fortement l'accès aux drogues dans ce compartiment. Mais pour autant, après des études *in vivo* chez le macaque infecté par SIV, les résultats ont montré :

- la présence de virus dans les tissus interstitiels, les cellules macrophages et lymphocytes T de singes,
- une susceptibilité à l'infection *in vitro* des macrophages testiculaires. Bien que faiblement productifs, la présence de particules infectieuses a pu être mise en évidence. Néanmoins, ce compartiment contribuerait de façon moindre à la dissémination du virus dans le sperme en comparaison avec les compartiments décrits précédemment [57].

Une étude *in vitro* récente a pu montrer que l'infection par HIV-1 entraîne une modification de la perméabilité de cette barrière [60]. En effet, il semblerait que la protéine Tat ait un rôle dans la perméabilisation de cette barrière, en induisant des changements dans l'expression des molécules du cytosquelette des cellules de Sertoli telles que l'actine, la vimentine, et les microtubules, et ainsi facilitent l'invasion de ce compartiment. Ces affirmations confirment le fait que le tractus reproducteur masculin peut jouer le rôle de réservoir sanctuaire pour HIV-1.

- **Gut associated lymphoid tissues (GALT)**

Le GALT est un des premiers tissus à être infecté après l'exposition à HIV-1. Il comporte des compartiments riches en CPA et également la plus haute concentration de cellules T CD4+, faisant de ce tissu un réservoir de choix pour le virus [61]. Ainsi, il a été estimé que la fréquence des cellules T CD4+ infectées dans l'intestin pouvait représenter jusqu'à 10 fois celle des cellules infectées dans le sang. Egalement, et de façon intéressante, il a été montré que les macrophages rectaux expriment un niveau plus élevé de CCR5, suggérant que la partie la plus distale de l'intestin serait plus vulnérable à l'infection par HIV-1 [62].

L'initiation d'ART dès 3 mois post-infection réduit considérablement l'établissement du réservoir mais ne permet pas son élimination, en partie dû à l'établissement très précoce du réservoir [63]. Un des premiers obstacles à l'éradication de ce réservoir est la faible pénétration des ARV dans ce compartiment, qui varie considérablement entre les différentes familles de molécules choisies. Pour exemple, le dolutegravir, un inhibiteur de l'intégrase du HIV-1, a une concentration 83% inférieure dans certaines zones du GALT à celle retrouvée dans le plasma [64]. En effet, la proportion de protéines récepteurs et transporteurs peut varier d'un compartiment à un autre. Ainsi il a pu être montré que la P-gp, qui gère l'efflux du Raltegravir, était presque 3 fois plus élevé dans l'angle gauche du colon que dans l'iléon ou la

partie colorectale [65]. Cela aurait donc pour effet de diminuer la concentration tissulaire de cette molécule dans cette partie du tractus digestif et de ce fait, son exposition maximale. En revanche cette hypothèse reste controversée étant donné qu'une dose suboptimale d'ARV dans ces tissus mènerait au développement de résistances contre ces médicaments, ce qui n'a pas été observé chez les patients de l'étude [66].

Pour résumer, bien qu'il ne soit pas aisé de maîtriser les barrières telles que la concentration élevée de cellules cibles dans ce compartiment, l'étude de la pénétration inadéquate des antirétroviraux dans le GALT ainsi que leur métabolisme et leur pharmacocinétique serait une approche intéressante pour l'élimination du réservoir dans ce site sanctuaire.

II. Souches virales chimériques SHIV pour l'étude de l'infection par HIV-1

Le modèle macaque/SIV s'est révélé très utile pour l'étude de l'infection mais partiellement pour l'évaluation de l'efficacité des vaccins puisque qu'il ne présente pas l'enveloppe du HIV-1 pour la mise en place d'anticorps neutralisants. HIV-1 est incapable de se répliquer chez les macaques dû à la présence de facteurs de restriction tels que TRIM5 α , ou encore APOBEC3G (décrits plus bas).

Pour permettre de mieux se rapprocher du modèle humain et ainsi étudier l'infection, la transmission, la cure de HIV-1 et sa prévention par anticorps neutralisants, des souches de virus chimériques ont été créées en laboratoire. Elles sont produites par l'assemblage de gènes de SIV et HIV, permettant ainsi de pallier aux restrictions. SHIV possède les gènes *env*, *rev*, *tat*, et *vpu* du HIV-1, incorporés en remplacement de ceux du SIV (**Tableau 2**). Lorsque l'enveloppe du HIV-1 est issue d'un virus ayant le tropisme X4, le virus chimérique reproduit la phase SIDA chez le macaque très tôt après l'infection, en éliminant massivement les lymphocytes T CD4. Lorsque l'enveloppe du HIV-1 est issue d'un virus ayant un tropisme R5, le virus chimérique reproduit une infection progressive similaire à celle provoquée par les souches SIV chez le macaque. Ces virus sont initialement peu pathogènes chez les macaques, mais plusieurs passages *in vivo* permet une augmentation de la pathogénicité chez le macaque [67]. C'est le cas de la souche duo-tropique SHIV_{89.6}, développée par l'équipe de Reimann, qui ne montrait qu'un certain degré d'infection après inoculation intraveineuse chez le macaque rhesus, sans pour autant mener à la déclaration de la maladie. En revanche, la transfusion en série du sang du macaque infecté a donné des variantes plus pathogènes,

SHIV_{89.6P} (isolé de PBMC, LN et rate) et SHIV_{89.6PD} (dérivé du plasma), qui a entraîné des charges virales plus élevées et un déclin des lymphocytes T CD4+, ainsi que l'évolution vers un stade SIDA [68].

La souche SHIV_{KU2} est basée sur l'enveloppe du HIV-1_{HXBc2} et de tropisme X4. Après passage en série dans des moelles de macaques pig-tailed, le virus est devenu hautement pathogénique, induisant des formes de SIDA létaux (2-3 semaines post-infection) chez les pig-tailed comme chez les rhésus [69]. Par ailleurs, il a été rapporté que l'infection chez le macaque rhésus menait à des maladies dégénératives du système nerveux central, probablement facilité par sa réplication dans les macrophages, le développement de maladies opportunistes et la libération d'IL-4 [70]. Il a également été montré que l'infection par voie muqueuse permettait le passage de la muqueuse cervico-vaginale et entraînait une diminution des cellules CD4+, menant à un syndrome d'immunodéficience.

Tableau 2 : Eléments constitutifs des souches chimères de SHIV

Souches et dérivés	Gènes SIVmac	Gènes HIV-1	Clade HIV-1	Tropisme
SHIV89.6 SHIV89.6P SHIV89.6PD	<i>gag, pol, vif, vpx, vpr, nef</i>	<i>env, tat, vpu, rev</i> de 89.6/HXBc2	B	X4/R5X4
SHIV-4 SHIVKU-1 SHIVKU-2	<i>gag, pol, vif, vpx, vpr, nef</i>	<i>env, tat, rev, vpu</i> de HXBc2	B	X4
SHIV162 SHIV162P3 SHIV162P4	<i>gag, pol, vif, vpx, vpr, nef</i>	<i>env, tat, rev, vpu</i> de SF162	B	R5
SHIVDH12 SHIVDH12R	<i>gag, pol, vif, vpx,</i> <i>20% vpr</i>	80% <i>vpr</i> de NL43 et DH12; <i>tat,</i> <i>rev, env, vpu, nef</i> de DH12	B	R5X4
SHIV1157i SHIV1157ip SHIV1157ipd3n4 SHIVipEL	<i>gag, pol, vif, vpx, vpr, nef</i>	<i>tat, rev, vpu</i> de HXBc2; <i>env</i> de l'isolat 1157i d'un nouveau-né Zambien	C	R5
SHIV-E-CAR SHIV-E-P4	<i>gag, pol, vif, vpx, vpr, nef</i>	<i>rev, tat</i> et <i>env</i> de l'ectodomaine de CAR-402; <i>rev, tat</i> et <i>env</i> du domaine TM de SF33	E	X4

Les SHIV X4 sont très sensibles aux réponses antivirales, ce qui en fait des modèles moins convaincants pour guider vers l'évaluation préclinique de vaccins et récapituler le cours de l'évolution d'anticorps neutralisants à large spectre.

Afin de s'affranchir des passages en séries pour augmenter la pathogénicité des souches chimères, de récents travaux menés par l'équipe de Shaw sur des souches SHIV de tropisme R5 (SHIV-SF162p3, SHIV-AE16 et SHIV-325c) ont permis d'améliorer leur fixation aux récepteurs CD4 de macaques rhésus. Ainsi, l'introduction d'une mutation sur le résidu 375 d'Env - région de la gp120 du HIV-1, a permis de renforcer et stabiliser cette interaction, entraînant ainsi une capacité de réplication virale supérieure *in vivo* [71]. Ces changements imitent les résidus volumineux ou hydrophobes généralement présents chez SIV. C'est ainsi que les SHIV portants des Env avec des substitutions aromatiques volumineuses se répliquent constamment dans les macaques rhésus, récapitulant de nombreuses caractéristiques de l'infection par le HIV-1 chez les humains. Ces SHIV sont efficacement transmis par les voies muqueuses et peuvent être utilisés pour des essais précliniques chez les macaques [72].

I. Evolution clinique et profils de patients

1) Les stades de l'infection et de la maladie

L'infection par HIV-1 se caractérise par une sur-activation associée à une inflammation chronique, aboutissant à une déplétion continue des lymphocytes T CD4, conduisant à l'épuisement de ces cellules et au déclin des fonctions immunitaires, menant au stade SIDA de la maladie. Cette évolution vers ce dernier stade, généralement comprise entre 3 à 10 ans, est fonction du profil des patients et de facteurs intrinsèques liés aux propriétés des souches virales, mais pas forcément en fonction de la dose initiale de l'inoculum [73]. On distingue trois phases dans l'évolution de la progression de la maladie, décrites ci-dessous (**Figure 8**).

a) Primo infection, phase éclipse et aiguë

L'infection résulte, dans la plupart des cas, d'une transmission par voie sexuelle d'une souche ayant un tropisme R5. Cette transmission peut être favorisée en fonction de l'état physiologique des barrières muqueuses : il apparaît que dans 60% des cas d'infection, cette muqueuse présente des microlésions. Le virus traverse la muqueuse soit par transcytose, soit capté *via* les prolongements des cellules dendritiques sentinelles [74]. Après infection, le virus devient progressivement difficilement détectable dans le plasma pendant une période de 7 à 21 jours, appelée « phase d'éclipse » et cliniquement silencieuse (**Figure 8**). S'en suit une phase où le virus se réplique activement et la virémie augmente de façon exponentielle, entraînant un déclin du taux de cellules T CD4. La phase aiguë dure en moyenne 2 à 6 semaines, jusqu'à la détection d'anticorps spécifiques à HIV-1. Durant cette période, le système immunitaire est encore capable de contrôler le virus et de stabiliser significativement la virémie, notamment par le biais des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques effecteurs activés. Ceux-ci vont permettre la lyse des cellules infectées *via* la sécrétion et la libération de perforine, granzyme B et de cytokines pro-inflammatoires. Des symptômes grippaux apparaissent dans 70% des cas, caractérisés par de la fièvre, des maux de têtes, de la fatigue ou encore des éruptions cutanées. Ces différentes phases de l'infection ont été caractérisées et modélisées par Fiebig et collaborateurs, selon l'apparition des marqueurs biologiques

cliniques de cohorte d'individus primo-infectés [75]. Cette classification de Fiebig est composée du stade I au stade VI :

- **stade I** (7 jours: HIV-1 présent dans les échantillons sanguins, test ARN positif, autres tests négatifs ;
- **stade II** (5 jours) : tests ARN et antigène p24 positifs, autres tests négatifs ;
- **stade III** (3 jours) : tests ARN, antigène p24 et IgM positifs, Western Blot (WB) négatif ;
- **stade IV** (6 jours) : tests ARN, antigène p24 et IgM positifs, WB indéterminé ;
- **stade V** (70 jours) : tests ARN, antigène p24 et IgM positifs, WB positif sauf réactivité p31 ;
- **stade VI** (durée non déterminée) : tests ARN, antigène p24 et IgM et WB complet positifs.

HIV-1 cible essentiellement les lymphocytes T CD4 impliquées dans la médiation et l'activation de la réponse immunitaire. Ces cellules représentent près de 80% des cibles infectées au site d'infection et jusqu'à 90% dans le système lymphatique [76]. Le virus entraîne des dérèglements de l'homéostasie et de la prolifération de ces cellules dans le sang et les tissus lymphatiques. Il en résulte une déplétion due à un taux de destruction supérieur à leur production [77]. Cette destruction est liée à un important phénomène d'apoptose induit par différentes protéines virales Env gp120, Tat, Vpr, Nef et Vpu, en concomitance avec la toxicité des LT [78]. HIV-1 détruit également l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale, permettant ainsi aux bactéries du microbiote et leurs dérivés hautement immunogènes (LPS), à provoquer une invasion bactérienne et une sur-activation de l'immunité. Cette sur-activation augmente également le taux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, l'IL-6 et le TNF- α .

b) Phase chronique et phase de latence virale

Un déclin de la virémie caractérise l'entrée dans la phase chronique de l'infection ; elle s'accompagne de la diminution des symptômes et peut ainsi passer inaperçue pendant près d'une décennie. Cependant, une des caractéristiques de l'infection par HIV-1 est la persistance anormale de l'activation de l'immunité, particulièrement durant cette période de faible activité virale [79]. Cette activation se manifeste à travers trois mécanismes clés incluant : i) la présence de cellules T à phénotype mémoire présentant des marqueurs de l'activation, ii) l'augmentation du nombre de lymphocytes T et B entrant en apoptose, et enfin, iii) le fort relargage de cytokines pro-inflammatoires. Ces caractéristiques mènent à une stimulation et une activation continue des cellules de l'immunité conduisant à une inflammation systémique et à leur épuisement [76]. Durant cette phase, le virus continue de se

répliquer et d'infecter les cellules activées. La persistance du provirus dans le génome des cellules hôtes, associée à de nombreuses mutations au sein du génome des cellules infectées lui permettent d'échapper aux réponses immunes spécifiques, empêchant son éradication. Comme dit précédemment, cette phase asymptomatique est associée à une diminution progressive des lymphocytes T CD4, supérieure à leur production (**Figure 8**). En absence de traitement antiviral, cette phase chronique évolue en syndrome d'immunodéficience acquise, SIDA.

c) La phase SIDA

Cette phase est caractérisée par un effondrement du taux de cellules T CD4 (< 200 cellules/mL de sang) [77]. Cette détérioration de l'immunité entraîne une susceptibilité aux infections opportunistes, associée à une augmentation des risques de développer une anémie, une perte de poids, de la fièvre ainsi qu'une adénopathie [80]. En l'absence d'ART, la progression de l'infection met en moyenne 7 à 10 ans chez 80% des individus infectés [81]. En revanche, 10% des individus infectés présentent une progression plus rapide alors qu'une troisième catégorie de patients montre un profil de progression plus lent. Ces différentes catégories d'individus sont décrites ci-dessous.

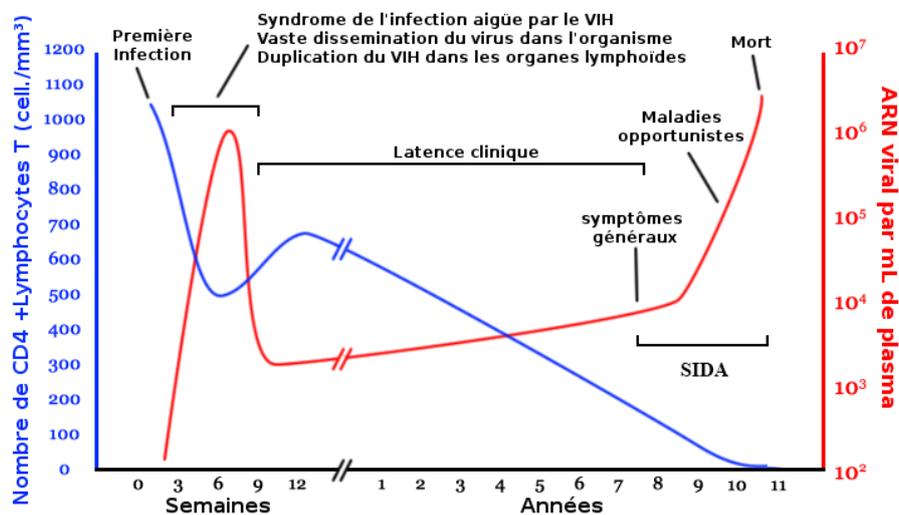


Figure 8 : Stades d'évolution de la maladie (adapté de [73]). L'infection par HIV-1 est caractérisée par trois phases : la phase aiguë qui débute après l'infection et dure en moyenne 9 semaines, et où un pic d'ARN viral apparaîtra ; la phase chronique lorsque le virus sera sous contrôle temporaire du système immunitaire. Cette phase de latence peut durer environ 7 à 8 années. Enfin, la phase SIDA, où le taux de LT CD4 est inférieur à 200/mm³, et l'ARN viral augmente de façon exponentielle, découlant sur la mort de l'individu.

2) Profils de patients

Différents profils de patients ont été recensés selon la rapidité de l'évolution de l'infection ainsi que des aspects immunologiques de chacun.

a) Les progresseurs classiques

Ils représentent la majorité des sujets infectés. Le nombre moyen de lymphocytes T CD4+ commence à chuter drastiquement dès les premières semaines post-infection jusqu'aux alentours de 500 lymphocytes/ μ L de sang. En parallèle, le virus se multiplie et se dissémine dans l'ensemble de l'organisme et particulièrement dans les organes lymphoïdes. Cette charge virale importante et la multiplication virale rapide corrént avec une augmentation du risque de transmission du virus. Des variants avec une capacité de réplication plus rapide vont également émerger au cours de la progression vers la phase SIDA [82].

b) Les progresseurs « rapides »

Pendant la phase aigüe, cette catégorie de patients présente une charge virale particulièrement élevée qui ne chute pas comme chez les progresseurs classiques. Ainsi, la phase chronique chez ces patients est raccourcie pour induire une phase SIDA en 1-3 ans. Peu d'études ont été réalisées sur ces patients liées à leur courte espérance de vie. Néanmoins, des études suggèrent une accélération de la progression de l'infection due à des interactions complexes entre des facteurs viraux et l'hôte. Ainsi, les Human Leukocyte Antigen (HLA) de classe I, ou les gènes tels que HLA-B*35, -A*29 et -B*22 ont été associés avec la progression rapide vers le SIDA [83].

c) Patients progresseurs lents et non-progresseurs à long terme (LTNP – Long Term Non-Progressor) et Contrôleurs Elite

Cette catégorie regroupe les patients infectés par HIV-1 qui ne développent pas la phase SIDA et ceux qui progressent vers le SIDA après au moins 12-15 ans. Ils représentent moins de 10% des infectés. En absence d'ART, les LTNP contrôlent spontanément la virémie à un seuil inférieur à 5000 copies d'ARN viral/mL plasma, et ce sur plus de 8 ans. Ces patients présentent également un taux de LT CD4 normal, supérieur à 500/ μ L de plasma.

Plus récemment, une sous-catégorie dite 'contrôleurs virémiques' a été identifiée, incluant des patients dont la charge virale était comprise entre 50 et 2000 copies d'ARN/mL plasma. Vingt pourcents des LTNP, soit moins d'1% des patients HIV-1 positifs ont la capacité de contrôler

totalemment la réplication virale, avec une virémie indétectable (< 50 copies/mL de plasma). Ces individus sont catégorisés 'contrôleurs élite' (EC, pour Elite Controllers) [84]. De nombreux travaux ont été réalisés afin de comprendre les mécanismes des restrictions mis en jeu et d'identifier les corrélats de protection associés.

Des facteurs liés à l'hôte, mais également liés aux virus ont été mis en évidence.

3) Caractéristiques génétiques et immunologiques des patients « contrôleurs »

a) Prédispositions génétiques

Parmi les LTNP, une surreprésentation de certains allèles du HLA-I, ayant un rôle dans la modulation de la réponse immune de l'hôte à l'infection, a pu être identifiée. Ainsi, certains *loci* auraient des effets protecteurs et seraient fortement associés à la résistance à l'infection, comme c'est le cas pour le HLA-B*27 et HLA-B*57. Il a été montré que des LT CD8 spécifiques du HIV-1 portant ces épitopes seraient résistants à la suppression médiée par les cellules T régulatrices (Treg), et ainsi continueraient à proliférer et à contrôler l'infection [85]. Cela pourrait également s'appliquer aux cellules T CD4. Par ailleurs, indépendamment des souches virales infectantes, le HLA porté par les LT CD8 des LTNP serait plus efficace que celui des progressseurs classiques en termes de capacité cytotytique et de sécrétion de plusieurs cytokines [86]. Chez les patients contrôleurs, la présence de ces *loci* permettrait une réponse en cellules T CD8 plus efficace contre le virus, capable d'atténuer fortement la primo-infection.

b) Immunité plus efficace :

Pereyra *et al.* ont reporté un taux significativement plus important de cellules T CD4 et CD8 spécifiques de HIV-1, sécrétant simultanément de l'IFN- γ et de l'IL-2 chez les contrôleurs élites et les contrôleurs virémiques, avec un taux plus bas d'anticorps neutralisants [87]. En plus de l'efficacité accrue de l'immunité chez ces patients, le niveau d'inflammation est bien inférieur à celui des progressseurs classiques. Cette caractéristique est de grande importance et corrèle avec le contrôle de l'infection comme l'a démontré une étude comparant des LTNP à des patients en phase d'infection aiguë et des sujets sains [88]. Ainsi, des cytokines Th1 et Th2 étaient sécrétées en quantités plus importantes chez les patients en phase aiguë que chez les LTNP.

Chez les sujets dits « HIV contrôleurs », il a été montré que les cellules T CD8, principalement Gag-spécifiques étaient capables d'éliminer *ex vivo* le virus autologue compétent pour la réplication [89]. Contrairement aux cellules d'individus virémiques, les

cellules T CD8⁺ spécifiques des patients contrôleurs peuvent proliférer et générer des réponses multifonctionnelles *in vitro* avec production de perforine, sécrétion de chimiokines et de cytokines lors d'une stimulation avec les Ag spécifiques [89]. L'importance de cette multifonctionnalité a été soulignée précédemment, notamment pour les cellules T CD8 exprimant le co-récepteur CCR5 [90]. Les cellules T CD4 jouent aussi un rôle important, notamment avec un effet antiviral direct des CD4 spécifiques. En effet, une prolifération importante de ces cellules a été mise en évidence en réponse à l'antigène Gag, avec un effet cytotoxique dû à la sécrétion de perforine [88].

Une étude intéressante a également montré une activité télomérase constitutive dans les LT CD8 de patients contrôleurs mais non chez les progresseurs, qui les protégeraient contre la sénescence. Ces différences pourraient en partie expliquer la capacité de contrôle de ces patients. La longueur des télomères redeviendrait normale après blocage de la voie PD-1/PD-L1 [91].

Enfin, les données d'une étude plus récente révèlent que les cellules des patients non-contrôleurs utilisent le glucose comme source d'énergie et sont programmées pour se multiplier. Au contraire, les cellules de patients contrôleurs sont programmées pour la survie, la production rapide de molécules antivirales (Granzyme B, CCL3, FasL, TNF- α , IFN- β) et sont capables de mobiliser plusieurs sources d'énergie. Ainsi, ces dernières seraient plus efficaces et adaptables pour éliminer les cellules infectées [92].

4) Caractéristiques virales identifiées chez les patients « contrôleurs »

Le séquençage du génome de HIV-1 a pu mettre en évidence que certaines souches dérivant de patients LTNP possèdent des caractéristiques d'atténuation par la présence de mutations et de larges délétions dans certains gènes des protéines régulatrices ou accessoires. C'est le cas du gène *nef*, qui joue un rôle important dans la pathogénicité en modulant négativement l'expression du CMH-1 et du CD4, pour favoriser la réplication virale. Il a été montré que l'infection de macaques par une souche SIV_{mac239} délétée du gène *nef* n'induisait pas de maladie, avec une charge virale contrôlée. L'infection subséquente de ces macaques par les souches pathogéniques a démontré une protection efficace avec un contrôle de la virémie et l'absence de la progression vers le SIDA [93]. L'importance de Nef est également appuyée par des observations chez l'homme, où la substitution de l'acide aminé en position 138 de la

protéine Nef s'accompagne d'une diminution de la réplication virale chez les LTNP [94]. Egalement, la substitution d'acides aminés en positions 22-24 ou 56-61 est associé à l'abolition de la régulation négative du CD4 et du CMH-I chez près de 40% d'enfants infectés par HIV-1 qui présentent des délais dans la progression de la maladie [94].

Parallèlement à ces données sur Nef, des mutations sur Vpr abolissent la capacité du virus à induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 ainsi que l'apoptose des cellules infectées. Ces cas restent néanmoins très peu répertoriés. L'absence de Vpu pourrait expliquer la diminution de la sévérité de la maladie chez les patients infectés par HIV-2 [94].

La compréhension approfondie des facteurs sous-jacents de l'hôte qui forcent l'atténuation virale chez les LTNP fournira de nouvelles pistes pour le développement de stratégies de lutte contre HIV-1.

II. Les défenses de l'hôte contre l'infection

Plusieurs catégories de réponse de l'hôte contre l'infection sont mises en place : les facteurs cellulaires de restriction de l'infection virale, l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Les facteurs cellulaires de restriction de l'infection virale constituent une défense passive et affectent le cycle de réplication viral à différents niveaux.

L'immunité innée représente la première ligne de défense active, mais n'est pas spécifique de l'infection HIV-1. C'est une réponse large contre les éléments du non-soi (virus, bactéries, parasites et fongiques) et/ou du soi-modifié telles que les cellules cancéreuses. Elle prend effet immédiatement et peut durer jusqu'à 96 heures (4 jours).

Lorsque l'immunité innée ne suffit pas à contrôler l'infection, un second type de réponse plus spécifique se met alors en place : l'immunité adaptative. Elle englobe deux types de réponses coordonnées : l'immunité à médiation humorale, pilotée par les lymphocytes B producteurs d'anticorps et l'immunité à médiation cellulaire, majoritairement représentée par les lymphocytes T.

1) Les facteurs de restriction cellulaire

Des protéines cellulaires antivirales naturelles de l'hôte permettent de limiter l'infection et la multiplication virale en inhibant directement ou indirectement certaines étapes du cycle viral (**Figure 9**). Elles présentent pour la plupart une activité à large spectre (sur différentes familles de virus). Ces protéines peuvent être produites constitutivement ou être induites par l'infection *via* l'interféron.

Les facteurs de restrictions contre HIV-1 les plus connus sont les suivants :

a) APOBEC 3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) - A3G) A3G est une désaminase identifiée en 2002, et qui s'incorpore dans le virion lors de son bourgeonnement à la surface de la cellule infectée (**Figure 9**). Lors de l'infection d'une nouvelle cellule par le virion mature, A3G va provoquer un nombre conséquent de mutations lors de la transcription inverse de l'ARN en ADN, en changeant les Cytosine en Uracile. Il en résulte une accumulation d'Adénosines en remplacement des Guanosines dans le provirus de la cellule nouvellement infectée. Ceci va entraîner non seulement la production de protéines virales totalement modifiées, mais aussi prématurément terminées à cause de l'apparition de codons stop (TAA, TAG ou TGA), menant à l'inhibition de la réplication et de l'infection virale [95]. Cependant, HIV-1 possède dans son génome un gène *vif* (pour Viral Infectivity Factor) codant une protéine qui permet de contrer cette restriction. Vif cible A3G et permet son ubiquitinylation, menant à sa destruction par la voie du protéasome et empêchant les dommages à l'ADN viral [96]. L'inhibition de l'interaction entre Vif et A3G pourrait être une piste de réflexion pour cibler de nouvelles molécules antivirales. Une étude récente présente une stratégie basée sur la thérapie génique, avec des lentivecteurs contenant une séquence codante pour A3G mutée résistante à Vif. Lorsque ce vecteur est introduit dans les cellules CEM, la protéine A3G mutée entraîne la suppression de la réplication de HIV-1 pendant une période plus de trois mois et demi [97]. Dernièrement, des études ont montré un autre rôle de la famille APOBEC3 : ces enzymes se lient de manière compétitive à la matrice d'ARN ou à la transcriptase inverse (RT) et agissent comme un obstacle à la polymérisation de l'ADN. Ainsi, dans le cas d'APOBEC3G, celle-ci est capable de diminuer l'efficacité de la synthèse d'ADN médiée par la transcriptase inverse en se liant à la matrice d'ARN, plutôt qu'en interagissant physiquement avec la transcriptase inverse. L'inhibition indépendante de la désamination de la RT peut être un mécanisme utilisé par APOBEC3G pour ralentir la formation d'ADN proviral et augmenter le temps pendant lequel l'ADN simple brin est

disponible pour la désamination par APOBEC3G, plutôt qu'un mécanisme direct utilisé par APOBEC3G pour la restriction du HIV-1 [98].

b) TRIM5 α (Tripartite Motif-containing protein 5, isoform alpha)

Identifié en 2004, TRIM5 α est un dimère de protéines cytoplasmiques reconnaissant la capsid des rétrovirus. Elle s'y fixe grâce à une sous-unité SPRY, et s'organise en mailles autour des protéines de la capsid pour inactiver les étapes post-entrée (**Figure 9**). Bien que la version humaine de TRIM5 α ne reconnaisse pas la capsid du HIV-1, c'est un mécanisme bien connu et très efficace chez le macaque rhésus, empêchant l'infection productive par HIV-1. TRIM5 α est donc importante pour la protection lors de la transmission inter-espèces des rétrovirus [99].

Trois mécanismes possibles, médiés par TRIM5 α ont été décrits pouvant conduire à l'élimination du virus [99].

- La décapsidation prématurée : la fixation de TRIM5 α serait nécessaire à elle seule pour rompre la capsid, et interrompre le cycle d'infection,
- L'ubiquitinylation : les unités de TRIM5 α ainsi formées seraient capables de recruter des enzymes E2 capables de catalyser l'ubiquitinylation de la capsid, conduisant au recrutement du protéasome, et à la destruction de la capsid [100],
- la formation de virosome : TRIM5 α va entrainer le complexe vers la voie du phagosome, qui par l'intermédiaire du lysosome abouti à la destruction de la capsid.

c) SAMHD1 (Sterile alpha motif and histidine-aspartate domain containing protein 1)

Ce facteur a été plus récemment décrit, en 2011. C'est une phospho-hydrolase qui permet la déplétion du stock cellulaire de dNTP disponibles pour la rétrotranscription, empêchant ainsi la synthèse de l'ADNc viral (**Figure 9**). SAMHD1 est inhibée par les protéines virales Vpr (ou Vpx chez SIV et HIV-2). Vpx est capable de lier SAMHD1 à l'enzyme ubiquitine-ligase, entraînant sa dégradation après recrutement du protéasome [101]. En plus de son activité de dNTPase, SAMHD1 possède une activité exonucléase sur les ADN simple brins ou l'ARN, qui serait responsable de la prévention de l'infection par HIV-1 [102].

d) BST2 (Bone marrow stromal cell antigen 2, ou Tetherine)

L'activité antivirale de la tetherine a été démontrée en 2008. Elle retient les virions bourgeonnants à la surface cellulaire grâce à un domaine transmembranaire et un bras extracellulaire terminé par un segment de glycosylphosphatidylinositol (GPI) agissant comme une ancre (**Figure 9**). Bien que le mécanisme exact d'interaction soit encore peu élucidé, au

vu du large spectre d'action de la tetherine avec de nombreux virus, il semblerait que celle-ci se fixe sur une protéine située dans l'enveloppe lipidique [102]. La tetherine aurait également un rôle dans la signalisation NFκB et permettrait l'activation des réponses immunitaires innées.

La protéine Vpu d'HIV-1 contrecarre son effet selon deux modes d'action : soit par ubiquitinylation de la tetherine, entraînant sa dégradation par le protéasome ; soit en induisant le mauvais trafic de la tetherine, empêchant la capture des virions et leurs dégradation [101].

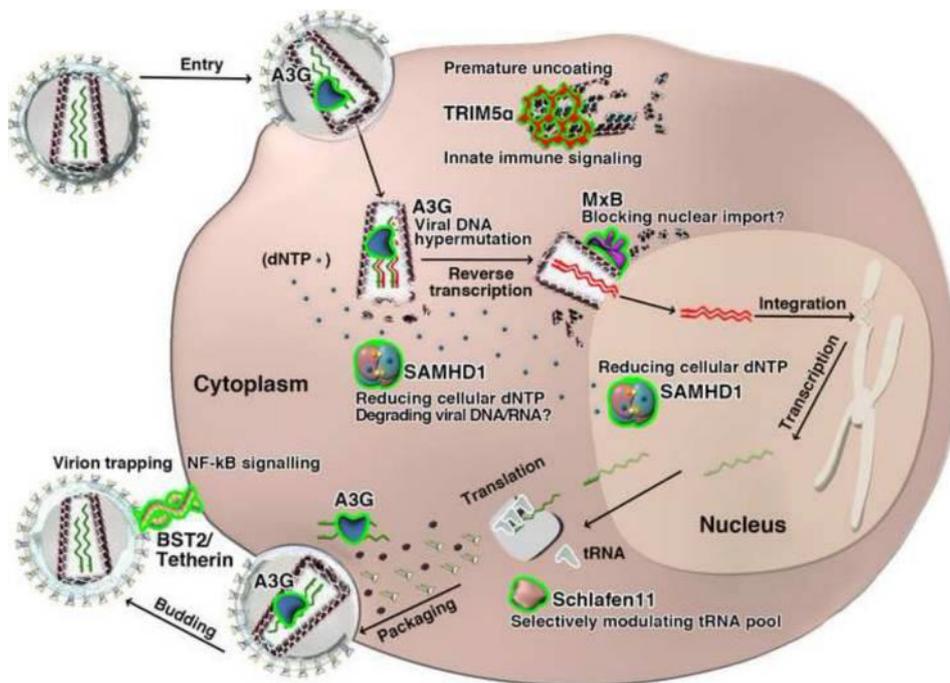


Figure 9 : Schéma des différents facteurs de restriction cellulaires et leurs effets sur HIV-1. [101]

2) Les micro-ARN (miARN)

Les miARN sont de petits ARN non-codants, codés par des gènes eucaryotes présents dans des régions intergéniques ou des introns au sein du génome. Ces petites molécules régulent plusieurs processus cellulaires, notamment la différenciation et la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, les processus métaboliques et les conditions pathologiques telles que le cancer. La fonction principale des miARN consiste à supprimer l'expression de leurs gènes cibles au niveau post-traductionnel, en se liant à l'UTR 3' de leurs ARNm cibles et en bloquant la traduction ou en provoquant leur dégradation. Les miARN ont été largement étudiés dans le cancer. Cependant, ils peuvent également renseigner les processus liés aux maladies infectieuses, en particulier celles affectant les infections virales provoquées par des

virus comme HIV-1. L'organisme est capable de réguler à la hausse ou à la baisse des miARN spécifiques, affectant la machinerie utilisée par les virus de manière bénéfique ou préjudiciable. Ces miARN peuvent cibler directement des composants viraux. Plusieurs miARN cellulaires et miARN circulants se sont montrés altérés au cours de l'infection par HIV-1. Certaines de ces altérations sont une réponse de l'organisme pour tenter de contrôler la réplication et la propagation du virus en modulant indirectement les protéines cellulaires : c'est le cas par exemple des cellules immunitaires qui sont capable de diminuer l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR5 afin de diminuer la capacité du virus à infecter les cellules cibles [103]. Egalement, les hsa-miR-29a et 29b exprimés par les PBMC humains sont capable de diminuer l'expression de Nef et ainsi d'interférer avec la réplication virale [104]. En revanche, les niveaux d'expression de miARN de l'hôte peuvent être modifiés par le virus pour les utiliser à son avantage, généralement en séquestrant ou en inhibant les miARN régulant la machinerie cellulaire. Il a aussi été montré une augmentation des miARN ciblant HIV-1 dans les LT CD4 primaires non-activés, en comparaison avec les LT CD4 activés (miR-28, -125b, -150, -223, -382), inhibant la production virale dans ces cellules, et pouvant contribuer à la latence virale [105].

Les virus peuvent également induire leurs propres miARN, appelés v-miR, qui sont codés par le génome viral, et moduler les miARN cellulaires à leur avantage, ou encore inhiber des molécules cellulaires ciblant leurs propres transcrits. C'est le cas du gène *tat* qui induit miR-TAR, un microARN qui va entraîner la régulation à la hausse des miARN cellulaires miR-21 et -22 exprimés par les LT CD4, et menant à la résistance de l'apoptose de ces cellules. Ainsi, cette résistance va mener à l'expansion et à la persistance du HIV-1 dans ces cellules [106].

Les miARN cellulaires jouent des rôles importants dans la réplication virale, soit usurpés par le virus pour favoriser sa réplication, soit employés par l'hôte pour contrôler l'infection virale en ciblant directement le génome viral ou les protéines cellulaires nécessaires à la réplication productive du virus.

3) Immunité innée

Les défenses innées correspondent à des molécules produites spontanément par l'organisme en réponse à la menace. Il s'agit des anticorps naturels, des défensines et cytokines pro-inflammatoires, du système du complément et des cellules granulocytes. Les tissus agressés produisent des molécules de l'inflammation, telles que le facteur tissulaire (activateur de la

coagulation) et les dérivés de l'acide arachidonique que sont les leucotriènes et prostaglandines.

Lorsque la barrière cutanée ou la muqueuse est lésée, elle n'est plus sélective et devient perméable aux micro-organismes et aux cellules infectées. Les agents pathogènes possèdent à leur surface des récepteurs PAMPs (pour Pathogens Associated Molecular Patterns) qui sont reconnus par les PRR (pour Pattern Recognition Receptors) à la surface des cellules dendritiques, macrophages, natural killers, granulocytes ainsi que les fibroblastes et les cellules épithéliales résidentes. Cette reconnaissance va entraîner la phagocytose de l'agent pathogène puis la sécrétion de signaux de dangers tels que des cytokines pro-inflammatoires - Interleukine (IL-) 1, IL-6, IL-12 et IL18, et le TNF- α (pour Tumor Necrosis Factor). Ce microenvironnement va aboutir au recrutement de cellules de l'immunité au site de l'inflammation. Cette première réponse immunitaire n'est pas spécifique de l'agent pathogène rencontré, elle permet d'agir rapidement mais avec une faible efficacité.

Lors de l'infection par HIV-1, la reconnaissance par les cellules de signaux de danger (PAMP et DAMP) met en jeu différents PRR. Les TLR (pour Toll-Like Receptor) sont une famille de récepteurs transmembranaires comprenant un site de liaison au ligand du côté membranaire, et un domaine pour la transmission du signal intracellulaire (TIR) [107]. Plusieurs TLR ont été identifiés, reconnaissant différents composants étrangers (acides nucléiques, protéines, lipides...). Les TLR-7 et -8 jouent un rôle important dans la signalisation du HIV-1, ils sont généralement présents dans les endosomes et ils sont chargés de reconnaître les motifs d'ARN simple brins (ARNsb) [108]. Cette reconnaissance va entraîner une cascade de signalisation menant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6...) permettant l'activation du système immunitaire. Egalement, la production d'IFN de type I participe à la mise en place d'un système de défense antiviral. Les TLR-2 et -4 reconnaissent les glycoprotéines virales sécrétées dans le milieu extracellulaire [109].

En plus de l'ARNsb, l'ADN viral exogène peut être détecté par une autre famille de PRR lors de la rétro-transcription de l'ARN : les récepteurs à ADN cytosolique, et en particulier les protéines cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase). La liaison de l'ADN viral va déclencher une cascade de signalisation médiée par STING (Stimulator of IFN Genes), permettant l'activation de la voie NF κ B et IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3), et la production des IFN-I et des cytokines inflammatoires [110]. La différence de structure des acides nucléiques (simples/doubles brins, méthylé/non, coiffé/non) et leur localisation, permet aux cellules de

détecter les molécules associées à un danger (matériel génétique issu d'un pathogène, ADN endogène endommagé).

Les cellules Natural Killer (NK) sont issues de cellules souches hématopoïétiques CD34+ de la moelle osseuse. Elles sont capables de cibler les cellules qui présentent une diminution ou une perte de l'expression des molécules de CMH-I et de les éliminer par lyse, grâce à la sécrétion de perforines et de granzymes. Egalement, elles peuvent signaler la présence de pathogènes, de cellules tumorales ou encore la présence d'un stress physico-chimique grâce à l'expression de ligands de stress. Enfin, elles sont capables de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Récemment, des chercheurs ont mis en évidence chez les singes verts africains qui sont capable de contrôler l'infection par SIV, que lorsqu'ils étaient déplétés de leurs cellules NK, la réplication virale devenait massive dans les follicules. En effet, les NK expriment le récepteur CXCR5 à leur surface lors de l'infection par SIV, les attirant vers les follicules des ganglions lymphatiques contrairement à ce qu'il se passe à l'état physiologique, et permettent le contrôle de la réplication virale [111]. Il a également été montré chez l'homme une fonction cytotoxique des NK plus importante ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ chez des individus non-progresseurs à long terme, en comparaison avec des individus progresseurs, montrant un impact important des NK dans l'immunosurveillance de HIV-1 [112]. En revanche, il semblerait que l'infection virale ait un effet délétère sur les fonctions des NK. Une étude a montré que dès la phase aiguë, une partie de la population de NK des sujets infectés était dysfonctionnelle, et que cette proportion de cellules était corrélée avec l'augmentation de la virémie. Par exemple, le récepteur Siglec-7 serait perdu lors de la primo-infection chez les progresseurs, mais pas chez les sujets non-progresseurs à long terme [113]. Ces résultats montrent un rôle important de l'immunité innée et des NK dans la lutte contre HIV-1.

Les monocytes et les macrophages sont à l'interphase de l'immunité innée et adaptative du fait de leur rôle de CPA, au même titre que les DC. Toutefois, malgré leur rôle clé dans l'élimination du virus, ces CPA ont un rôle contradictoire en faveur de la dissémination du virus à d'autres cellules. Lors de la phagocytose des particules virales, celles-ci sont alors digérées en fragments antigéniques afin d'être présentés aux cellules immunitaires par les récepteurs CMH et TCR (pour T-cell receptor) à la surface des cellules immunitaires. Dans certains cas, et comme décrit plus en détail dans le Chapitre I, une fraction de virus phagocytés n'est pas dégradée et reste dans des vésicules ou vacuoles à l'intérieur des CPA, permettant ainsi la transmission du virus de cellule-à-cellule dans une synapse

immunologique (**Figure 10**). Ce mode de transmission a été caractérisé comme étant crucial pour la propagation du virus, plus efficace que l'infection des cellules saines par une particule virale libre dans la circulation [114]. La persistance de l'agent pathogène permet d'induire une réponse plus spécifique : la réponse adaptative. Cette dernière développe des effecteurs à action immédiate, mais est aussi capable d'induire des réponses mémoires persistantes.

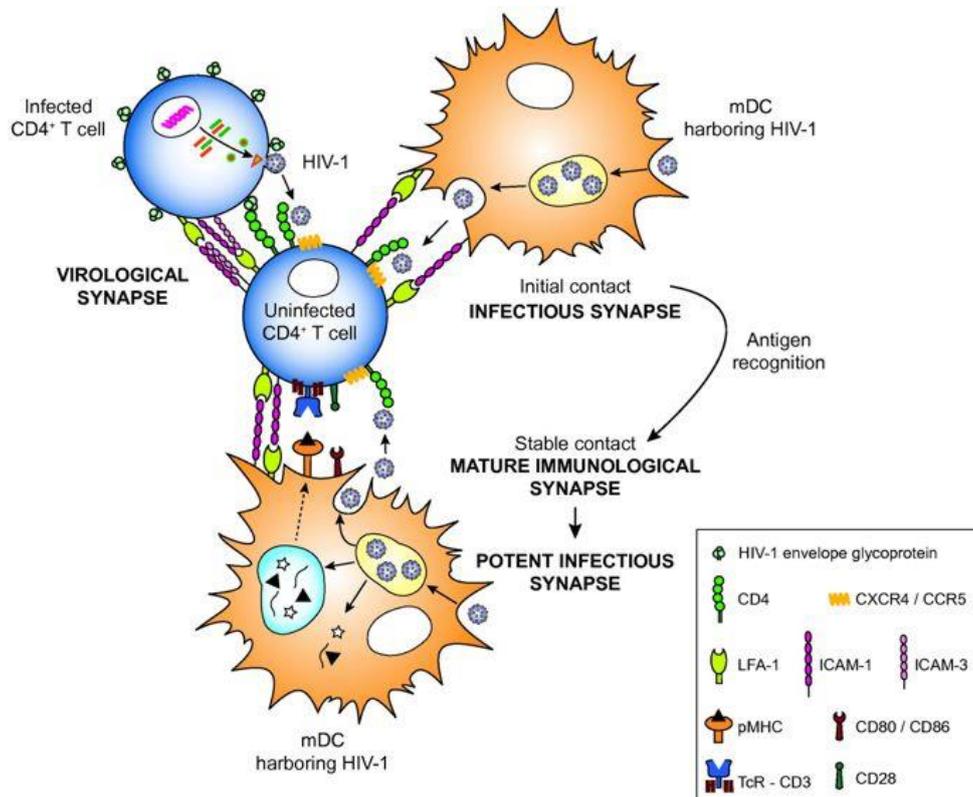


Figure 10 : Formation d'une synapse virologique [114]

4) Immunité adaptative

L'immunité adaptative est composée de deux volets de population cellulaire qui jouent un rôle complémentaire : la lignée des lymphocytes B (LB), productrice d'anticorps (Ac), et la lignée des lymphocytes T (LT) comprenant les cellules T CD4⁺ dites « helper » ainsi que les T CD8⁺ cytotoxiques (LTC).

a) Immunité humorale

L'immunité humorale est caractérisée par une production d'anticorps circulants par des plasmocytes issus de la différenciation terminale d'un clone de lymphocyte B activé. Les plasmocytes se trouvent dans les organes lymphoïdes périphériques tels que les ganglions, la rate ou la moelle osseuse. Cette activation des cellules B s'effectue selon deux axes :

- Activation CD4-dépendante, avec l'orientation des cellules T CD4 helper vers un phénotype Th2. Il en résultera une sélection clonale des cellules B, leur activation puis une réponse spécifique à l'antigène,

- Activation CD4-indépendante, non liée à l'activation par les cellules T CD4 et ne donne pas lieu à une sélection clonale des lymphocytes B. La réponse engendrée sera alors faiblement affine contre l'antigène rencontré.

Les anticorps sont des immunoglobulines (Ig) de différents types :

- Les **IgM** sont les premières produits lors d'une infection pour aller très rapidement s'attaquer à l'agent pathogène. Elles sont pentavalentes et sont dotés d'une grande avidité pour les antigènes. Elles ont un rôle majeur dans la formation des complexes immuns.
- Les **IgG** de haute affinité, elles apparaissent après les IgM et jouent un rôle essentiel dans la neutralisation de l'infection des agents pathogènes et dans la cytotoxicité liée aux anticorps.
- Les **IgE** sont le support de l'allergie immédiate (réaction d'hypersensibilité type 1).
- Les **IgA** sont secrétées au niveau des muqueuses, elles permettent la neutralisation des agents pathogènes présents sur les épithéliums (bronches, mais également muqueuses vaginale et rectale,...) et peuvent jouer un rôle important pour empêcher l'infection par HIV-1 transmise par voie sexuelle. Ils sont retrouvés sous forme monovalente dans le sang et sous forme bivalente dans les sécrétions mucosales.

Les Ig sont synthétisées sous forme de deux chaînes glycosylées et associées entre elles. La synthèse des anticorps par les plasmocytes est le résultat d'une réponse spécifique initiée par un antigène étranger (non-soi). En règle générale, les anticorps agissent de trois manières différentes : soit par l'activation du complément, soit par fixation du complexe immun sur une cellule immunitaire comme les macrophages ou les cellules NK possédant un récepteur pour le fragment constant des anticorps, ou soit par action de neutralisation du pathogène.

- **Lymphocytes B**

Les cellules B sont générées dans la moelle osseuse à partir de précurseurs lymphoïdes. Si les lymphocytes B parviennent à produire un récepteur des cellules B (BCR, pour B cell receptor)

fonctionnel non auto-réactif, elles se différencieront en cellules B matures naïves. Ainsi, un répertoire primaire très diversifié de cellules B naïves sera généré [115]. Dans les organes lymphoïdes périphériques, l'association du BCR et d'un antigène du non-soi induit un signal positif à la cellule B. Cette stimulation aboutit à la multiplication cellulaire, ou prolifération clonale. Des mutations apparaissent progressivement au cours de la prolifération clonale, liées à la stimulation et multiplication cellulaire, où les gènes codant la partie constante de la chaîne lourde des Ig subissent une commutation de classe.

Le lymphocyte B présente l'antigène *via* le CMH-II, ainsi que par l'interaction entre le récepteur CD40 à la surface du LB et le ligand CD40L présent sur le LTh. Cette interaction nécessite un contact direct entre les deux cellules, et est indispensable à la commutation de classe. Les cellules B activées vont migrer en périphérie et dans les tissus lymphoïdes secondaires, ou alors seront activées localement par les cellules dendritiques. L'interaction LB/LTh conduit à une prolifération de plasmocytes de courte durée de vie, sécrétant initialement des IgM, puis des IgG et IgA [116].

Les plasmablastes peuvent également migrer dans des niches spécialisées de la moelle osseuse, où ils se différencieront en plasmocytes à longue durée de vie, sécrétant de grandes quantités d'anticorps hautement affins sur des périodes prolongées. Ces cellules vont permettre la défense directe et continue face aux agents pathogènes, alors que les cellules mémoires circulant dans l'organisme vont fournir des réponses immunitaires renforcées et améliorées [117]. Lors de la différenciation en cellule mémoire B, le gène *bcl2* est activé et sa protéine protège ce phénotype de la mort cellulaire.

L'infection par HIV-1 mène à des dysfonctionnements phénotypiques et fonctionnels tels que la baisse de la capacité de prolifération des cellules B et de la diversité des Ig produites, ainsi que l'augmentation de la différenciation des LB vers un stade terminal. Ceci est dû principalement à l'activation persistante des cellules B durant l'infection, résultant en une réponse Ac polyclonale moins affine et à une hypergammaglobulinémie [118]. En outre, la déplétion des cellules T CD4 serait un facteur clé dans ce dysfonctionnement. Également, les individus infectés par HIV-1 présentent un niveau plus bas de cellules B mémoires, et les réponses Ac peuvent être affaiblies pour certaines pathologies infectieuses telles que la grippe, les infections à pneumocoques ou encore dirigées contre la toxine tétanique [119].

- **Anticorps neutralisants AcN**

Les AcN permettent neutralisation des virus libres, l'élimination des cellules infectées et l'inhibition de la transmission intercellulaire du HIV-1. Ils agissent en interférant avec la fixation des glycoprotéines d'enveloppe de l'agent pathogène, empêchant ainsi leur fixation sur les récepteurs des cellules cibles. Le complexe agent pathogène/AcN est alors phagocyté et dégradé par les cellules spécialisées.

Certains de ces anticorps sont qualifiés d'anticorps neutralisants à large spectre (bnAbs, pour broadly neutralizing antibodies). Dans le cadre de l'infection par HIV-1, 10 à 20% des patients infectés non traités développent ces anticorps deux à quatre ans après l'infection. Ils sont capables de neutraliser l'infection de différentes souches du HIV-1 *in vitro*, mais malheureusement sans ART, cette présence de bnAbs n'est pas corrélée avec le contrôle de la réplication virale puisque des souches résistantes finissent par émerger. Une récente étude a identifié une activité antivirale supplémentaire des bNAbs, qui bloquent la libération du HIV-1 en fixant des particules virales à la surface des cellules infectées en grands agrégats. Cette activité ciblant le site de liaison CD4 et les boucles V1/V2 ou V3 inhibent la libération virale des cellules infectées et corrèle avec la capacité des bNAbs à se lier à Env à la surface cellulaire et à neutraliser les particules virales acellulaires [120]. La bivalence des anticorps est nécessaire pour cette rétention virale et pour que les virions agrégés soient neutralisés.

Lors de l'infection par HIV-1, en plus de la dérégulation des lymphocytes T CD4, le répertoire des lymphocytes B ainsi que différents points de contrôles sont eux aussi altérés, rendant encore plus défavorable l'élaboration des anticorps neutralisants [121]. Des essais chez le macaque ont été entrepris avec l'injection par voie vaginale [122] ou intraveineuse [123] de AcN. Les macaques ayant reçu ces anticorps sont devenus résistants à l'infection par la souche de SHIV pathogénique contrairement aux macaques non traités. Sur cette base, de nombreuses avancées ont été réalisées pour le développement de bNAbs à partir de clones de lymphocytes B humains à des fins thérapeutiques.

Les premières générations d'AcN ont été développées dans les années 1990. De très nombreux AcN ont été isolés depuis, à partir de patients infectés par HIV-1 afin de déterminer ceux ayant une action efficace de neutralisation et le plus large spectre d'action sur différentes souches, pour des essais cliniques. Les anticorps neutralisants agissent sur différentes fractions de la glycoprotéine d'enveloppe du HIV-1, et peuvent ainsi être utilisés en combinaison afin de multiplier les cibles d'action. Ces différents sites d'accroche permettent de classer les AcN en différentes familles (**Figure 11**).

Les sites les plus conservés de l'enveloppe du HIV-1 sont masqués par de nombreux radicaux glycanes liés à une glycosylation importante à ces endroits, créant une gêne allostérique et empêchant la fixation des anticorps. En revanche, certains domaines sont des sites privilégiés de fixation des anticorps : c'est le cas du CD4 binding site (CD4bs), des boucles variables V1/V2 et V3 ainsi que la région MPER [124]. Les Ac de nouvelle génération permettent la neutralisation de différentes souches de HIV-1 à de très faibles concentrations [124].

Plus récemment, un vaccin basé sur des monomères de gp120 et des trimères de gp140 mimant la protéine d'enveloppe du HIV-1 a permis la production d'AcN à large spectre d'action contre les trimères de gp140 chez le lapin mais une faible immunogénicité chez le macaque [125]. Suite au récent succès de l'induction vaccinale de ces cellules chez le macaque et l'homme, de nombreux d'essais vaccinaux se sont focalisés sur des immunogènes permettant de développer les cellules B précurseurs de bnAbs. Néanmoins, il n'est pas facile de produire et d'induire une maturation adéquate de ce type d'Ac, puisque les modifications génétiques et les mutations qui ont lieu lors de la maturation des cellules B sont rares. Des stratégies innovantes sont nécessaires pour développer un vaccin capable de produire des Ac de ce type [126]. Seul un très faible pourcentage de cellules B précurseur naïves de la lignée germinale auront ce potentiel de développer des cellules B matures sécrétant des bnAbs [127].

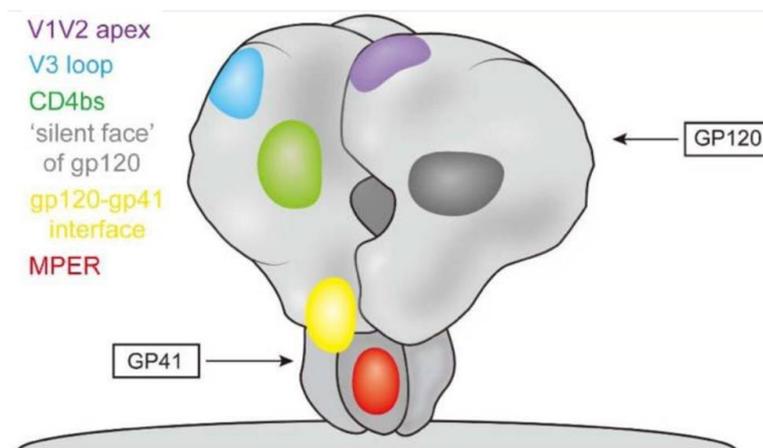


Figure 11 : Différents sites de fixation des anticorps neutralisants à large spectre sur les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 [119]

Bien que les essais avec ces AcN aient apporté la preuve d'un corrélat de protection, et que les efforts soient déployés pour leur induction chez l'homme, leur administration thérapeutique

comporte des inconvénients. En effet, la demi-vie de ces anticorps reste relativement courte et par conséquent, nécessite des injections répétées pour maintenir des taux sériques ou mucosaux suffisants pour la neutralisation [128, 129]. De plus, de fortes doses pourraient être nécessaire afin d'atteindre la concentration optimale *in situ*, pouvant engendrer des problèmes d'auto-immunité. Ces effets secondaires sont de moins en moins fréquents étant donné l'avancement des biotechnologies de production de ces Ac. Récemment, un essai clinique a été entrepris pour comparer l'effet de l'anticorps VRC01-LS au VRC01 parental [130]. VRC01 est un anticorps monoclonal à large spectre d'action qui cible la région du CD4bs. La modification permet de prolonger de plus de 4 fois la demi-vie sérique de cet anticorps en augmentant l'affinité de liaison au récepteur Fc. En outre, cette modification permet de réduire la fréquence d'administration.

- **Anticorps facilitants**

Bien que les anticorps permettent le contrôle de l'infection en empêchant l'entrée du virus dans les cellules hôtes, il a été démontré que certains anticorps apparaissant au stade précoce de l'infection peuvent avoir un effet inverse et la cellule cible. Cette facilitation est fortement aidée par le système du complément, et les cellules portant son récepteur. En effet, lorsque l'anticorps se fixe sur la glycoprotéine d'enveloppe, cette interaction peut recruter les protéines du complément. Ce complexe va alors se fixer sur les récepteurs du complément à la surface des cellules cibles du HIV-1, et ainsi engager l'opsonisation du complexe Ac-virus à l'intérieur de ces cellules [131]. Dans cette condition, le virus peut rester infectieux pendant des mois, et ainsi participer à l'établissement d'un réservoir et à l'infection de cellules à cellules [132].

- b) **Immunité cellulaire**

L'infection par HIV-1 est persistante et entraîne le développement d'une pathologie chronique. Elle implique la mise en place d'une réponse immunitaire persistante pour permettre son contrôle. Cette réponse nécessite la mise en place de cellules mémoires à longue durée de vie. Néanmoins, durant l'infection, de nombreux stades de différenciation des cellules spécifiques du virus sont bloqués par les facteurs viraux, impactant fortement la résolution de l'infection.

Les LT sont caractérisés par la présence de marqueurs à leurs surface tels que le CD3, CD4, CD8 ; mais également par leur capacité effectrice qui se traduit par la prolifération importante, la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines inflammatoires.

Plus l'état de différenciation de ces LT sera avancé, et plus ces capacités effectrices seront augmentées (**Figure 12**).

Les différentes molécules de différenciation exprimées à la surface des lymphocytes T définissent les phénotypes des sous-populations comprenant les cellules T-Naïves (T_N), les cellules T souches mémoires (T_{SCM} , pour stem cell memory), les T à Mémoire Centrale (T_{CM}), les T Effectrices Mémoires (T_{EM}) et les cellules T Effectrices (T_{EFF}).

Les T_N : Il s'agit du phénotype le moins différencié, et n'ayant jamais rencontré l'antigène. Les T_N possèdent ainsi les capacités de survie et de renouvellement les plus élevées. Ces cellules présentent le récepteur CD45RA à leur surface, mais en revanche n'expriment pas le récepteur CD95, marqueur pro-apoptotique. Après stimulation antigénique, ces cellules peuvent se différencier pour générer tous les autres phénotypes mémoires ou effecteurs.

Les T_{SCM} : Elles ont été décrites récemment à l'interphase des cellules naïves et des cellules mémoires [133]. Cette sous population de cellules T est dotée d'une importante capacité d'auto-renouvellement, associé au caractère des cellules souches, et une longue durée de vie. Ces cellules ont été tout d'abord identifiées chez la souris et les macaques rhésus infectés par une souche de SIV. Chez ces derniers, cette population de T_{SCM} persistante est présente dès 7 jours après l'infection [133]. Les études phénotypiques et fonctionnelles de la différenciation des cellules T à partir des cellules naïves ont permis de démontrer que ces cellules étaient pluripotentes mais que leur différenciation s'effectuait dans un sens unique :



Ainsi, contrairement aux cellules T effectrices qui possèdent le potentiel de se dédifférencier en cellules T mémoires, il n'y a pas de possibilité de dédifférenciation des cellules effectrices ou centrales mémoires en T_{SCM} [133]. Leur état faiblement différencié est contrôlé par LEF-1, qui intervient dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules et la régulation des molécules anti-apoptotiques Bcl-1 et Mcl-1 de la famille Bcl-2. Ces molécules sont exprimées dans les cellules mémoires, mais sont régulées à la hausse chez les T_{SCM} . De ce fait, elles corrélaient avec une forte capacité d'auto-renouvellement, une importante stabilité, et une forte diminution de l'apoptose [133]. Enfin, elles présenteraient de longs télomères, limitant ainsi leur sénescence [134]. Ces cellules sont capables de persister longtemps en l'absence de restimulation antigénique.

L'expression à leur surface des récepteurs IL-2R α et l'IL-7R α permet aux cytokines IL-7 et IL-15 d'interagir avec ces cellules pour permettre leur maintien, leur différenciation et leur renouvellement en l'absence d'antigène [135].

Les cellules mémoires T_{CM} résident dans les organes lymphoïdes secondaires où elles se renouvèlent et persistent. Ce « homing », est dû à l'expression de récepteurs CD62L et CCR7 après leur différenciation. La cytokine principale sécrétée par les T_{CM} est l'IL-2. En se différenciant, ces cellules perdent en capacité d'auto-renouvellement et acquièrent progressivement l'expression du marqueur pro-apoptotique CD95, entraînant une diminution de leur durée de vie. Les T_{CM} permettent de soutenir la réponse sur le long terme et de régénérer la population des cellules T effectrices mémoires, mais n'exercent pas de fonctions effectrices directement *ex vivo*.

Les T_{EM} : cette deuxième sous-population de cellules mémoires proviennent de la différenciation de cellules T_{CM} après restimulation antigénique. Elles ont perdu l'expression des récepteurs de homing CCR7 et CD62L, permettant leur circulation pour exercer leurs fonctions effectrices. Ces cellules s'attaquent très rapidement aux pathogènes au niveau du site d'entrée grâce à des propriétés cytolytiques et antivirales, avec production et sécrétion de granzyme B, perforines et d'IFN- γ élevées.

Enfin, **les cellules T_{EFF}** les plus différenciées possèdent la capacité sécrétrice la plus importante, mais les capacités de survie et d'auto-renouvellement les plus limitées [136]. La production de la perforine et du granzyme B corrèle avec l'activité cytotoxique contrairement à celle du granzyme A. Ce dernier est serait plutôt un marqueur pour l'étude de la fonctionnalité de ces cellules.

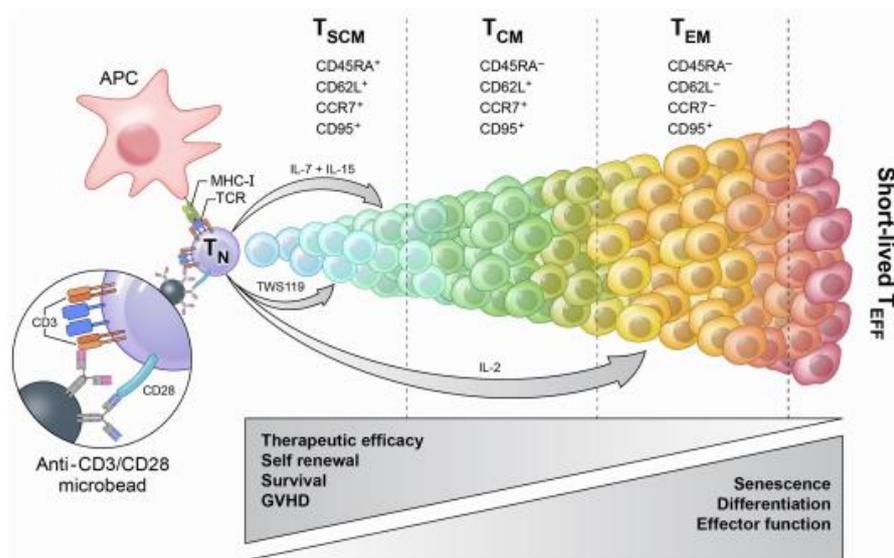


Figure 12 : Différenciation et caractéristiques des lymphocytes T : après stimulation antigénique, les cellules T naïves vont se différencier vers un profil effecteur dont la durée de vie va être plus courte mais les fonctions effectrices plus importantes (d'après [136]).

- Lymphocytes T CD4+ « helper »

Ces cellules, caractérisées par leur récepteur spécifique CD4, sont impliquées dans la médiation et l'activation des acteurs de l'immunité. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 qui permet le recrutement, l'activation et la prolifération des cellules T. Les LT CD4 sont essentielles pour la mise en place d'une réponse cellulaire T CD8 efficace, ainsi que pour celle des LB. Ces cellules sont aussi la cible de l'infection par HIV-1 lorsqu'elles sont activées. Différents sous-ensembles de LT CD4 ont été mis en évidence, caractérisés par des fonctions spécifiques en réponse à différents signaux d'infections. On compte parmi eux les cellules Th1, Th2, Th17 et Treg [137].

Les réponses polarisées Th1 permettent de soutenir la réponse des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, et sont responsables du contrôle des agents pathogènes intracellulaires tels que HIV-1. Elles sécrètent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-12, IFN- γ ou le TNF- α induisant la réponse à médiation cellulaire.

Les réponses Th2 sont impliquées dans le soutien des LB, *via* la sécrétion de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13, qui aident à la prolifération et la différenciation des cellules B [138].

Les cellules Th17 jouent un rôle dans la réponse inflammatoire contre les agents pathogènes extracellulaires.

Les Treg permettent de contrebalancer ces réponses Th1, Th2 et Th17, en jouant un rôle de régulation.

L'infection par HIV-1 entraîne un bouleversement de la capacité proliférative des LT CD4, ainsi que leur phénotype (perturbations des récepteurs à la surface) et la sécrétion de cytokines [139]. Il a été montré une augmentation du nombre de cellules T CD4 polyfonctionnelles (sécrétant plusieurs types de molécules pro-inflammatoires à la fois) dans les muqueuses chez les patients LTNP, contrairement aux patients progresseurs classiques [139] (**Figure 13**). Le contrôle de l'infection par HIV-1 requiert une activation des cellules T CD4 de bonne qualité. Celle-ci s'avère de moins en moins atteignable à mesure que la maladie progresse en raison de la chute drastique du nombre de LT CD4 [140, 141].

Les cellules T folliculaires helper (TFh)

Ces cellules ont été décrites dans les années 90. Elles sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires, et interagissent avec les LB avoisinants. L'interaction des LT CD4+ avec un DC dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires va permettre d'initier la différenciation de ces cellules en Lymphocytes pré-TFh. Chez l'homme, la différenciation des cellules CD4 en TFh est principalement médié par l'IL-12 [142]. Cette différenciation s'accompagne également de l'expression d'un facteur de relocalisation vers la zone B : le récepteur CXCR5, mais également du facteur de transcription Bcl-6 qui règle l'expression du CXCR5 ainsi que d'autres molécules importantes pour le développement et la fonction des TFh telles que le CXCR4, CCR7 ou PD-1 [143]. Ces LT pré-TFh vont ensuite migrer à la frontière de la zone B afin de stimuler les lymphocytes B, permettant leur différenciation en cellules productrices d'Ac de haute affinité. Les contacts répétés entre les LB et les cellules TFh dans le centre germinatif vont permettre la maturation des Ac grâce à l'hypermutation somatique et la commutation de classe isotypique.

Les organes lymphoïdes secondaires représentent un compartiment important lors de l'infection par HIV-1 pour la réplication du virus et en tant que réservoir viral. C'est le cas des ganglions lymphatiques contenant les cellules TFh, hautement susceptibles à l'infection et à la production de particules virales. Plus précisément, il s'agirait des cellules pré-TFh, qui elles expriment le récepteur CCR5 contrairement aux cellules TFh matures [144]. Il a été montré que l'infection se déroule précocément [145], mais également que le virus persiste

particulièrement bien dans ces cellules TFh, celles-ci présentant un profil similaires aux LT centrales mémoires, avec une longue durée de vie [146]. Dans une étude, la perte de cellules TFh dans les rates de macaques rhésus infectés par SIV_{mac251} pendant la phase aiguë a été décrite, montrant une altération de la différenciation de ces cellules. Cet échec serait dû à une perte de l'expression des facteurs de transcription Bcl-6 et c-Maf [146]. Dans ce contexte, cela entraîne la détérioration des interactions TFh/LB, conduisant à la perte des cellules B mémoires ainsi que de la production d'anticorps spécifiques anti-SIV. Il a également été montré dans d'autres études que le taux de cellules TFh était plus élevé dans les nodules lymphatiques de macaques non-progresseurs comparé à des macaques progresseurs [147, 148], et que le taux de cellules TFh dans la rate après infection par SIV était corrélé positivement avec la vitesse de progression vers un stade SIDA [146]. En revanche, le processus qui altère la capacité des cellules TFh à interagir avec les LB et ainsi impacter négativement la production d'IgG spécifiques de haute affinité chez l'homme n'est pas encore bien déterminé. Bien qu'essentiel pour le contrôle de l'infection par l'interaction avec les LB et la mise en place d'Ac spécifiques de haute affinité, ce compartiment cellulaire représente également un réservoir viral. Cette dernière caractéristique pourrait rendre obsolète la stratégie d'augmenter ce pool de cellule pour le contrôle de l'infection par HIV-1.

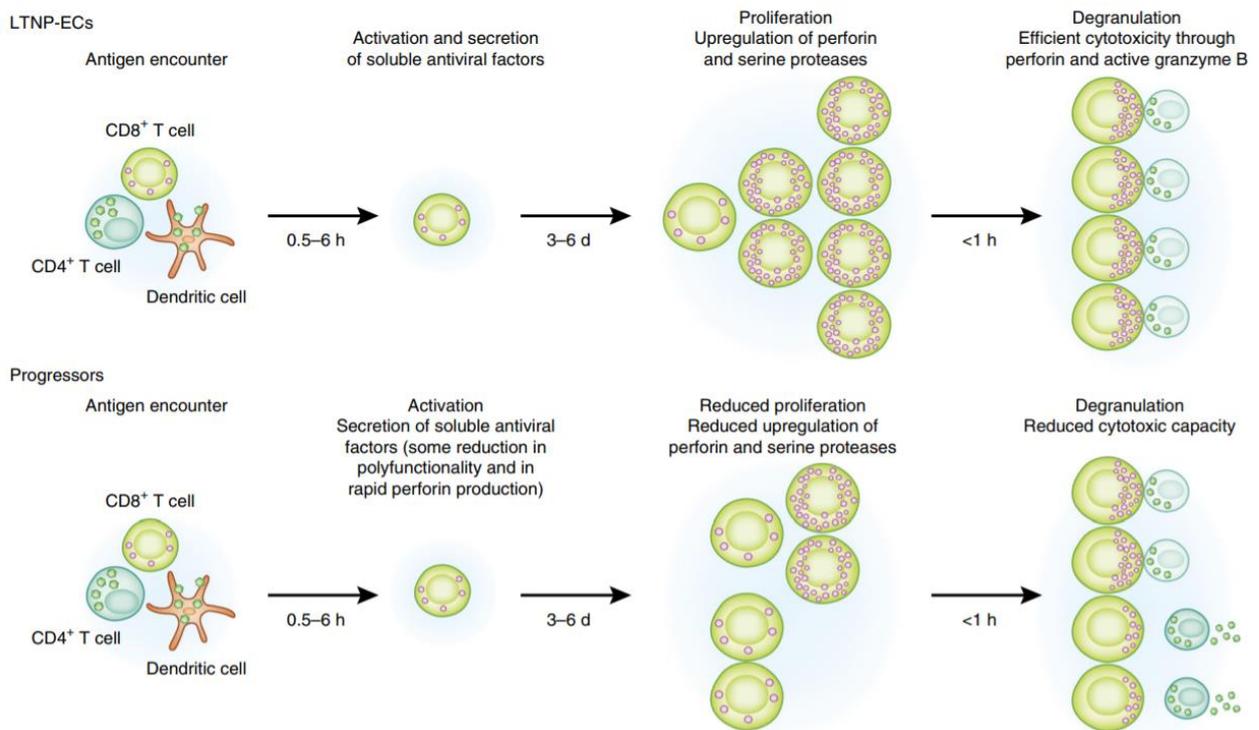


Figure 13 : Différences de réponses immunitaires entre les patients contrôleurs et progresseurs dans l'infection par HIV-1 (d'après [139]). La prolifération cellulaire et la production de molécules cytotoxiques réduite due à l'infection par HIV-1 impacte les capacités de réponses contre les cellules infectées

- Lymphocytes T CD8+ « cytotoxiques »

Appelés également lymphocytes T cytotoxiques pour leur capacité à produire et sécréter des molécules lytiques et des cytokines pro-inflammatoires, les cellules T CD8+ jouent un rôle important dans la lutte antivirale. Leur expansion est médiée suite aux signaux délivrés par l'activation des LT CD4 helper, notamment *via* la production d'IL-2, qui va ainsi permettre leur différenciation en cellules effectrices et mémoires [149]. Bien que ces deux phénotypes T_{CM} et T_{EFF} sécrètent des molécules cytotoxiques, il est établi que les cellules effectrices ont la capacité de sécrétion la plus cytotoxique, avec une production importante de perforine. Ces cellules sont localisées en périphérie plutôt que dans les organes lymphoïdes [150].

Après rencontre avec l'agent pathogène, les LT CD8 vont proliférer (phase d'expansion), se différencier et acquérir leurs fonctions effectrices (sécrétion de cytokines, cytotoxicité) [151]. Lorsque l'agent pathogène est éliminé, une phase de contraction est initiée, durant laquelle 95% des cellules vont entrer en apoptose. Les 5% restant vont survivre et se dédifférencier en cellules mémoires, dotées d'une durée de vie plus longue et permettant ainsi une réponse spécifique plus rapide lors de la nouvelle rencontre du pathogène (**Figure 14**) [149].

Les cellules T CD8+ jouent un rôle important pour le contrôle de l'infection par HIV-1, comme le relatent de nombreuses études sur les PNH et l'homme. Tout d'abord, une étude réalisée chez des macaques rhésus transitoirement déplétés de leurs LT CD8 et infectés par SIV, a montré une augmentation rapide de la virémie, puis une diminution de celle-ci dès le retour des LT CD8 [152]. Chez l'homme, l'apparition des LT CD8 spécifiques lors de la primo-infection corrèle avec la diminution de la virémie, permettant un contrôle partiel de la réplication virale. Enfin, chez les patients LTNP, il a été mis en évidence un taux plus élevé de CTL spécifiques du HIV-1, comparé à celui observé chez les patients progresseurs classiques [84]. Ces observations suggèrent leur importance dans le contrôle de la réplication virale.

Le niveau d'activation des LT CD8 est également essentiel dans le contrôle de l'infection ; il est fortement corrélé à la survie des patients infectés, indépendamment de leur charge virale. La qualité et non la quantité des réponses T CD8 est importante. En effet, une nette différence est observée chez les patients virémiques progresseurs mais pas chez les contrôleurs. Une perte partielle voire totale des fonctions effectrices de ces cellules a pu être mesurée chez les patients progresseurs classiques. Cette altération serait due à une diminution de l'expression du facteur T-bet, qui permettrait en conditions normales, la sécrétion en grande quantité du

granzyme B ou de la perforine [153]. Egalement, la diminution de l'expression des molécules du CMH par HIV-1 à la surface des LT CD8 entraîne une baisse de reconnaissance des cellules CD4 infectées [139]. Ainsi, le rôle des LT CD8 dans le contrôle de l'infection semble être primordial, avec à la fois une stimulation correcte par les LT CD4, ainsi qu'une sécrétion efficace des molécules inflammatoires et cytotoxiques et l'expression de récepteurs d'inhibition tels que CTLA-4, PD-1, CAG-3.

Il devient donc évident de cibler l'induction de ce type cellulaire par le biais de la vaccination afin de contrôler l'infection causée par HIV-1. Des travaux menés par une équipe japonaise ont permis de démontrer que la mise en place de cellules LT CD8 spécifiques de SIV-Gag permettait une immunité non stérilisante. En revanche, cette réponse corrélait avec le contrôle du virus SIV_{mac239} chez les macaques vaccinés jusqu'à trois ans après immunisation [154].

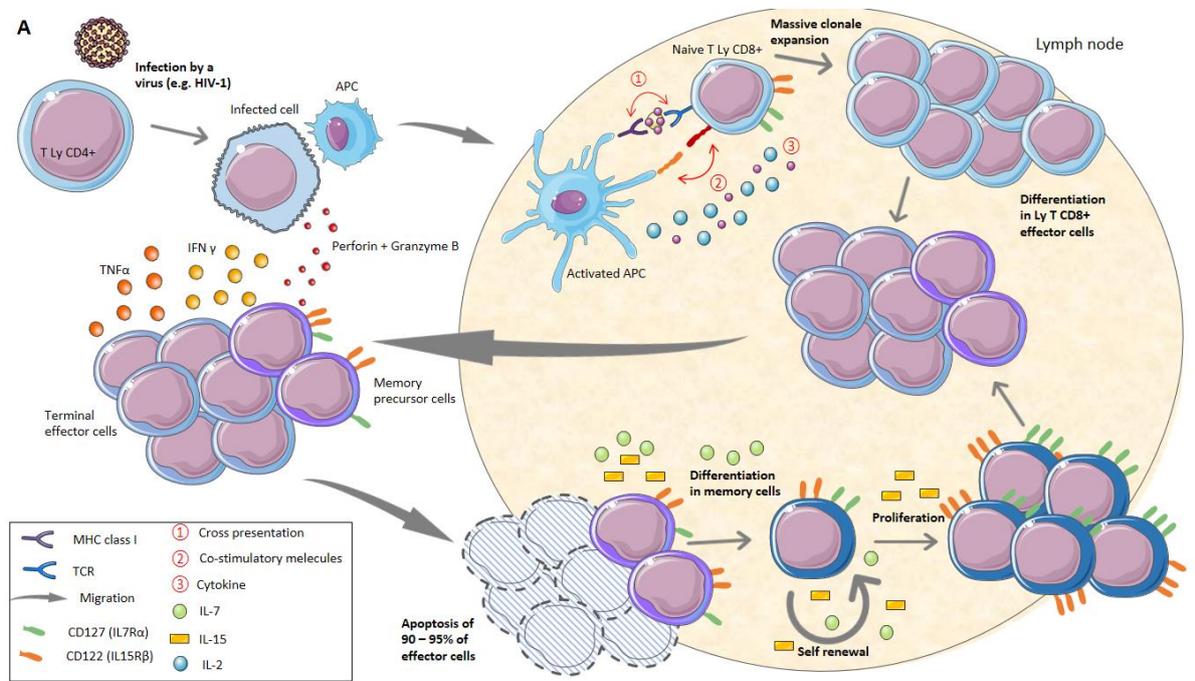


Figure 14 : Différenciation des cellules T CD8+ à partir de la cellule naïve jusqu'à la cellule mémoire suite à la présentation d'une molécule exogène par une cellule présentatrice d'antigène (APC).

La phagocytose d'un agent pathogène par les APC entraîne la fragmentation des antigènes et la présentation des fragments de peptides à leur surface via des molécules du CMH de classe I. Au cours de ce processus, l'APC s'active et migre vers le ganglion lymphatique, lieu de transit des lymphocytes T naïfs (CD127^{hi}, CD122^{int}). L'activation de ces cellules T CD8+ s'opère en 3 étapes principales : la présentation croisée entre le CMH I de l'APC et le récepteur des cellules T (TCR) du lymphocyte T ; en parallèle de leurs molécules co-stimulatoires ; et la libération de cytokines parmi elles l'IL-2. Suite à la différenciation en cellules effectrices (CD127^{lo}, CD122^{int}), les cellules matures migrent du ganglion lymphatique vers le site d'infection où elles libèrent de nombreuses molécules comme le TNFα, l'IFN-γ et la Perforine/Granzyme B pour attirer d'autres cellules immunitaires et combattre l'infection. Une sélection intervient après la phase de résolution, impliquant l'apoptose de 95% des cellules effectrices (cellules effectrices terminales) et laissant la possibilité aux cellules précurseurs mémoire de se différencier en cellules mémoire (CD127^{hi}, CD122^{hi}). Ces cellules mémoire ont la capacité d'auto-renouvellement, et lors d'une nouvelle rencontre avec l'agent pathogène elles prolifèrent plus rapidement que la première fois et permettent une élimination plus efficace de l'infection.

c) Lien entre immunité cellulaire et humorale : activité ADCC

La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (abrégée ADCC, pour Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), entraîne la lyse des cellules cibles infectées exposant les antigènes à leur surface. Cette lyse est médiée par les Ac attachés aux cibles cellulaires. Le récepteur Fc exprimé sur les cellules effectrices (NK, monocytes) déclenche la libération de molécules cytotoxiques, conduisant à la cytolyse de la cellule cible.

L'induction d'AcN est un des buts ultimes de nombreux essais vaccinaux, mais cette méthode s'est révélée ardue. Cette stratégie n'est pas la seule piste coïncidant avec le contrôle du virus par la réponse humorale. Comme démontré lors des analyses de corrélats de protection de l'essai clinique du RV144, le seul essai vaccinal ayant conféré une protection modérée contre l'infection par HIV-1, les anticorps non-neutralisants induisant une activité ADCC jouent un rôle important dans la protection contre l'infection par HIV-1 [155].

Les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 constituent le premier antigène viral exposé à la surface des cellules infectées et des particules virales. Sous sa forme non liée, Env apparaît dans une conformation « fermée » qui sera préférentiellement reconnue par les bNAb. La liaison au récepteur CD4 va modifier Env dans une conformation intermédiaire « partiellement ouverte », puis « ouverte », laissant accessible un nombre plus grand d'épitopes. Des études récentes suggèrent une relation entre la conformation d'Env et l'activité ADCC. Ainsi, les cellules infectées exposant Env dans la conformation « fermée » liée au CD4 sont sensible à l'ADCC. (**Figure 15**) [156]. Une faible proportion des isolats du HIV-1, désignée niveau 1A (3 %, dérivés de virus qui ont été fortement passés *in vitro*), possède un phénotype hautement sensible à la neutralisation. Les virus restants, désignés niveau 1B (19 %), présentant une sensibilité supérieure à la moyenne. La majorité des virus de niveau 2 (63 %) présente une sensibilité moyenne à la neutralisation. Enfin, les virus de niveau 3 (15 %) ont été distingués comme ayant un phénotype plus résistant à la neutralisation [156].

Néanmoins, HIV-1 peut échapper à l'ADCC en réduisant l'exposition des glycoprotéines Env à la surface de cellules infectées, et en dissimulant les épitopes induits par la fixation d'Env sur le CD4 [155]. De plus, Vpu peut protéger les cellules infectées contre l'ADCC par antagonisme de la tetherine. En bloquant la tetherine, Vpu empêche donc l'accumulation de virions à la surface, réduisant ainsi la disponibilité des glycoprotéines Env pour la liaison des anticorps et l'ADCC [155]. D'autres études ont également rapportées que la diminution de l'expression des CD4 par Vpu et Nef empêche son interaction avec Env à la surface de la cellule infectée, et donc réduisant fortement l'ADCC par les Ac sériques [157].

Dans une étude récente, il a été démontré l'implication des neutrophiles, le plus abondant des leucocytes, dans l'ADCC et la phagocytose dépendante de l'anticorps (ADP). Cette réponse est également bien plus rapide puisque son pic a été déterminé à 4h *in vitro*. *In vivo*, les réponses de l'ADP médiée par les neutrophiles corrèlent inversement à la charge virale des sujets de la cohorte [158].

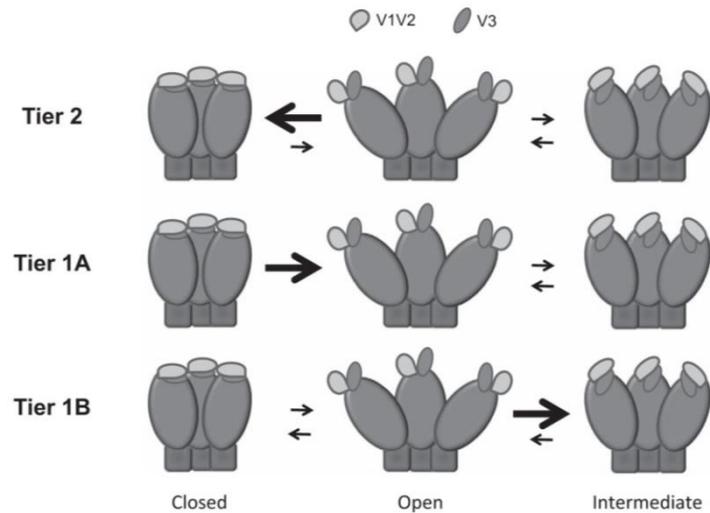


Figure 15 : Conformations de la glycoprotéine d'enveloppe du HIV-1 et impact sur la neutralisation virale par les Ac. [156]. La conformation ouverte de la glycoprotéine d'enveloppe va entraîner l'exposition de plus d'épitopes capables d'être reconnus par les anticorps. Ainsi un classement a été établi selon la susceptibilité de la souche virale à être neutralisée. Les virus Tier 1A, en conformation ouverte, seront plus sensibles à la fixation par les Ac, alors que les souches dites Tier 2 auront une conformation fermée, moins facilement neutralisables.

I. Mesures thérapeutiques

1) Antirétroviraux

Les antirétroviraux (ARV) ont permis une avancée considérable dans le traitement et la lutte contre le SIDA et le contrôle de la diffusion du HIV-1.

Le traitement est composé d'au moins 2 inhibiteurs nucléosidique/tidique de la transcriptase inverse (INTI) et d'un troisième non-nucléosidique/tidique de la transcriptase inverse (INNTI). La combinaison de différentes molécules antivirales permet d'une part de bloquer plus efficacement le cycle de réplication du virus, réduisant ainsi fortement la charge virale plasmatique sous le seuil de détection (< 50 copies d'ARN viral/mL de plasma) et d'autre part, de réduire voire annuler la transmission du virus, et enfin de permettre indirectement la reconstitution significative du système immunitaire.

Les ARV sont classés en différentes familles en fonction de leur action à chaque étape du cycle viral (**Figure 16**).

Bien que l'efficacité du traitement par HAART réduit considérablement la morbidité de la maladie, la mortalité des patients infectés par HIV-1 et la transmission du virus, ce traitement ne permet pas l'éradication de l'infection ni de l'épidémie. Ainsi, dans la plupart des cas l'arrêt du traitement entraîne la réactivation des provirus pour produire de nouveaux virions et mener au rétablissement de la réplication virale.

Comme le montre la **Figure 16b**, il est nécessaire d'avoir une combinaison d'ARV dont l'efficacité dure au moins 72h pour bloquer l'entièreté du cycle viral jusqu'aux étapes tardives [159]. Il est également nécessaire d'assurer un suivi régulier afin de repérer au plus tôt l'émergence de variants résistants qui entraînent un échappement viral menant à la réplication active du virus. Cependant, ce traitement reste encore non totalement accessible à tous les patients à cause de son cout financier et de l'inconfort lié aux effets secondaires associés à la prise quotidienne de certaines molécules.

a) Les inhibiteurs d'entrée

L'entrée étant la première étape du cycle viral, son blocage va permettre d'empêcher la transmission de l'infection aux cellules. Il existe différentes classes d'inhibiteurs d'entrée : l'attachement au récepteur CD4, l'ancrage aux corécepteurs, et l'inhibition de l'étape de fusion entre le virus et la membrane cellulaire.

Actuellement, deux molécules ont été totalement approuvées et régulièrement utilisées pour le traitement des patients infectés par HIV-1 :

- l'Enfuvirtide, un inhibiteur de fusion se fixant sur la gp41 et interférant avec le rapprochement des deux membranes,
- le Maraviroc, un antagoniste du corécepteur CCR5, bloquant l'infection des virus dotés d'un tropisme R5.

Des stratégies sont actuellement en phase d'essai pour inhiber l'interaction du HIV-1 avec le récepteur principal : le CD4. Dans ce sens, le Fostemsavir a été approuvé en 2020 seulement pour les patients en impasse thérapeutique [160]. Ce type de molécules ciblant la gp120 pourrait être plus efficace, puisque le CD4bs est plus accessible comparé à celui de la gp41 qui n'est exposé que brièvement après l'attachement de la gp120 au CD4. En revanche, les inhibiteurs de la gp41 ont un spectre d'activité plus large contre différentes souches de HIV-1 étant donné que la partie hydrophobe ciblée est plus conservée que le CD4bs de la gp120 [161].

b) Les inhibiteurs de la rétrotranscription

Il existe deux classes d'inhibiteurs de la RT virale : les inhibiteurs nucléosidiques (INTI) et les inhibiteurs non-nucléosidiques (INNTI) de la transcriptase inverse.

- Le mode d'action des INTI repose sur une compétition avec les nucléosides naturels (désoxynucléotides (dNT)) lors de l'élongation de l'ADN viral. Ces INTI vont être initialement phosphorylés par des kinases cellulaires au niveau de la fraction désoxyribose dans la cellule hôte. Contrairement aux dNT naturels, ils sont dépourvus du groupe 3'-hydroxyl, empêchant la formation d'un pont phosphodiester pour l'extension de l'ADN, agissant comme « terminateurs de chaîne » [162]. Ce mécanisme entraîne une toxicité puisque ces INTI peuvent être terminateurs de chaîne pour l'ADN de l'hôte. Les INTI sont les premiers à avoir été approuvés par la FDA pour leur utilisation chez l'homme, et 8 molécules sont commercialisées : l'abacavir, le didanosine, l'emtricitabine, le lamivudine, le stavudine, le tenofovir disoproxil fumarate, le zalcitabine, et la zidovudine.

L'émergence de souches avec une susceptibilité réduite pour les INTI proviendrait de diverses mutations d'acides aminés. Tout d'abord, une mutation de la RT avec des analogues de la thymidine entraîne un décrochage des INTI de la chaîne d'ADN en 3'. Également, ces mutations peuvent donner lieu à une discrimination entre le substrat dNT natif et les inhibiteurs. En revanche, ces mutations ont un impact sur le virus et vont faire chuter la fonctionnalité de la RT et ainsi la capacité de réplication virale.

- Les INNTI, ou inhibiteurs allostériques, vont inhiber la RT virale en se fixant sur son site catalytique. Ils vont interférer sur sa conformation en réduisant l'activité de la polymérase, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN viral [159]. Six molécules ont été approuvées : l'étravirine, le delavirdine, l'émtrévirine, la névirapine, le rilpivirine et le doravirine.

La résistance pour les INNTI est amorcée par des substitutions à l'endroit du site catalytique de la RT, mais n'entraîne qu'une légère perte d'affinité virale pour une résistance accrue à ces inhibiteurs [159].

c) Les inhibiteurs d'intégration

Depuis l'administration du premier inhibiteur d'intégrase en 2007, ces classes de molécules ont été largement choisies pour le schéma thérapeutique grâce à leur innocuité et efficacité. Ces inhibiteurs sont généralement bien tolérés et les taux d'abandon liés aux effets indésirables des médicaments ont été très faibles [163]. Quatre molécules sont commercialisées, divisées en deux groupes en fonction de leur structures : les agents de première génération, avec le raltegravir et l'élvitegravir, qui rencontrent moins de résistance ; et ceux de deuxième génération, comprenant le dolutégravir et le bicétegravir avec une haute barrière de résistance [163]. Le raltegravir interagit avec les métaux divalents dans le site actif de l'intégrase du HIV-1. Cette interaction inhibe l'insertion de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule infectée (processus de transfert de brin). L'élvitegravir est également un inhibiteur spécifique de l'étape de transfert de brin de l'intégration du HIV-1 [162].

La résistance au raltegravir se produit par des mutations qui diminuent la sensibilité de l'intégrase à ses inhibiteurs. Ces mutations réduisent l'efficacité de l'enzyme dans l'exécution du traitement des extrémités 3' de l'ADN du HIV-1 (réduction de 24% à 97% par rapport au type sauvage) ou du transfert de brins d'ADN (réduction de 10% à 97% par rapport avec le type sauvage) [164].

d) Les inhibiteurs de protéase

Dix inhibiteurs de protéase ont déjà été approuvés : amprenavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, et tipranavir. Le rôle primordial de la protéase dans le cycle viral, ainsi que sa petite taille de 11 kDa, permettaient de penser qu'il y aurait de rares cas de résistance face à cette famille d'inhibiteurs. Il s'est pourtant avéré que le gène de la protéase virale est doté d'une grande plasticité, avec une vingtaine de substitutions possibles liées à la résistance, et une grande capacité de polymorphisme (49 codons sur 99) [165]. Ces changements d'acides aminés pourraient avoir des effets délétères sur la capacité de réplication virale, mais pour compenser cette diminution, des changements sur huit sites majeurs de clivages du substrat (gènes *gag* et *pol*) ont été observés [166].

Il est maintenant établi que certaines molécules peuvent avoir un effet délétère, ou au contraire augmenter l'action d'autres molécules antivirales lors de combinaisons. C'est le cas du ritonavir, qui aurait un rôle potentialisateur sur le saquinavir, en inhibant sa métabolisation hépatique par le cytochrome P450 ce qui a pour conséquence d'augmenter son taux plasmatique [159] [167].

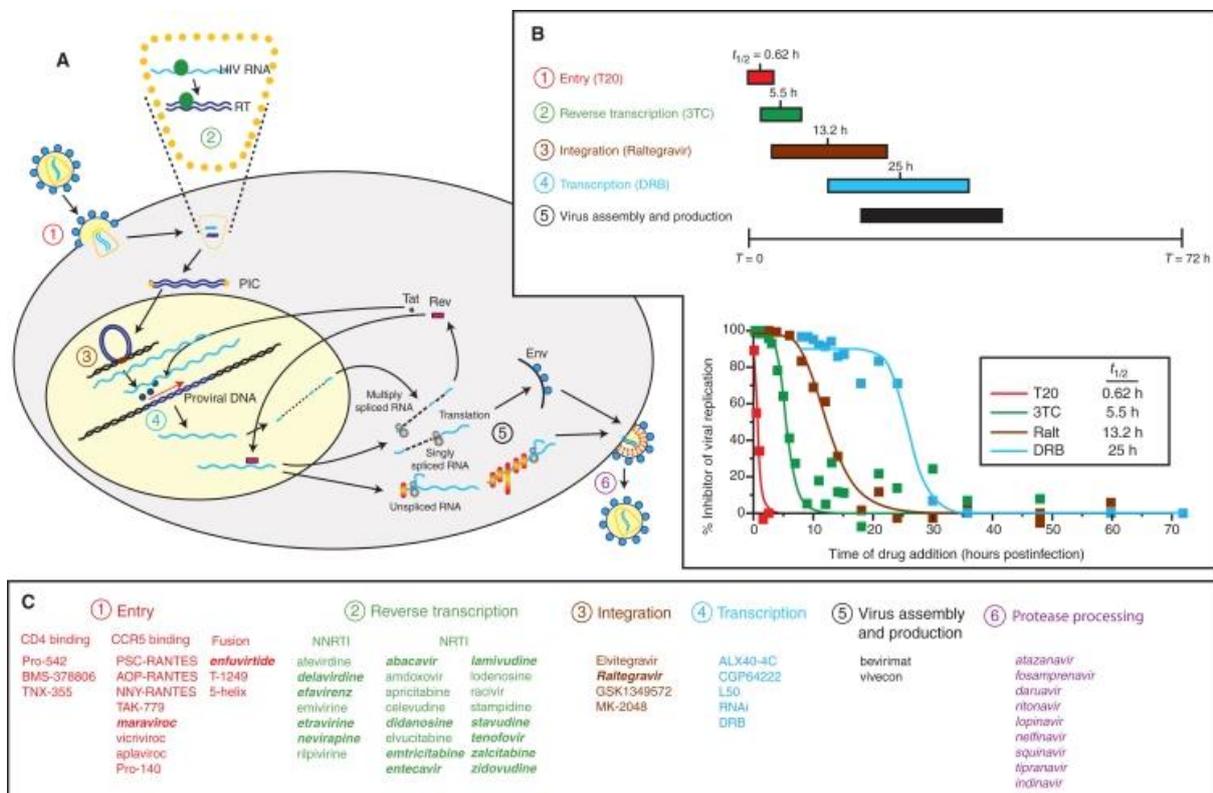


Figure 16 : Action des différentes familles d'antirétroviraux sur le cycle viral et leur demie vie (d'après [159])

2) Stratégie Kick and kill

Un des obstacles majeurs qui empêche l'éradication complète du virus par les traitements chez les personnes infectées est la latence provirale. Une des stratégies pour tenter de purger ce réservoir est la méthode dite « Kick and kill » (ou « shock and kill »). Cette méthode consiste dans un premier temps à stimuler (kick) les cellules pour réactiver les provirus qui vont exprimer les antigènes viraux à la surface des cellules et de les rendre sensibles aux drogues et aux cellules cytotoxiques (kill). Malgré plusieurs essais concluants *in cellulo*, les essais cliniques n'ont pas pu apporter la preuve de concept de l'efficacité de cette stratégie à éliminer complètement le réservoir viral. Ceci serait dû à l'efficacité partielle des agents de réactivation de la latence ainsi que l'influence des sites d'intégration du HIV-1 sur la réactivation. Dans une fastidieuse étude menée par Hugues et collaborateurs, plus de 2400 sites d'intégration ont été mis en évidence dans les PBMC de 5 donneurs infectés [168]. Par exemple, l'intégration du provirus dans les introns des gènes impliqués dans la croissance et le développement cellulaire *MKL2* (intron 6) et *BACH2* (intron 5) dans la même orientation que celle de la transcription, favoriserait la maintenance des cellules et indirectement, celle des provirus. Récemment, une équipe s'est proposé de comparer l'intégration des provirus dans différents tissus [169]. Les auteurs ont utilisé des cellules mononuclées du sang et des nodules lymphatiques de différents compartiments de donneurs infectés et placés sous ART. De façon surprenante, ils ont ainsi pu constater que la majorité des sites d'intégration du virus (71%), se localisait dans les introns quel que soit le compartiment ou l'évolution de la maladie. Par ailleurs, la distribution des sites d'intégration virale avait des caractéristiques comparables, quel que soit le type d'infection (aiguë, chronique ou pendant ART). Il est intéressant de noter que la réplication virale est limitée dans les tissus lymphoïdes pendant ART. De même, une faible tendance de sites d'intégration identiques dans des compartiments cellulaires différents conduisant à l'hypothèse qu'après infection, les LT CD4 infectés prolifèrent puis migrent entre les tissus.

Des travaux visant à élucider les raisons de la difficulté d'élimination les cellules du réservoir dans la stratégie "shock and kill" révèlent la résistance de cellules T CD4 à la cytotoxicité. Ces travaux ont également identifié de nombreuses voies de signalisation qui pourraient jouer un rôle dans cette résistance [170]. C'est le cas, entre autre, du gène codant pour Bcl-2 qui entraîne l'inhibition des voies de sécrétion de perforine et granzyme B ainsi que de la voie de signalisation Fas/FasL.

II. Mesures prophylactiques

1) PrEP

La PrEP (pour Prophylaxie Pré-Exposition ou Pre-Exposure Prophylaxis) consiste en la prise d'un traitement préventif avant l'exposition au risque. Elle concerne les individus à haut risques d'exposition mais non porteurs du HIV-1 (travailleurs du sexe, hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH), personnes transgenres, utilisateurs de drogues injectables...). La PrEP consiste en une association de deux antiviraux hautement efficaces contre le HIV-1 (Truvada®) : l'emtricitabine et le ténofovir disoproxil. Ces deux molécules sont très bien tolérées par l'organisme grâce à leur faible toxicité et présentent également un faible taux de sélection de souches virales résistantes pour les personnes infectées [171]. La prise se fait en une fois, au minimum 2h avant l'exposition à risque et 24-48h après. Cette prise peut être continue ou à la demande lors des périodes à risques. Ces deux schémas de prise ont montré une efficacité de protection équivalente [172]. Une étude entreprise par l'ANRS en 2019 sur 3000 participants à risque en France et au Canada (ANRS Prévenir) a démontré l'efficacité de la PrEP avec 99% chez les HSH [173]. Cette prophylaxie représente une réelle avancée dans la lutte contre l'infection par HIV-1, mais malheureusement, encore beaucoup de pays n'ont pas accès à cette solution en 2020 comme certains pays d'Afrique ou de l'Europe de l'Est ainsi que la Russie, la Chine ou l'Inde (**Figure 17**).

Une solution pour pallier cette difficulté d'accès serait de réduire le nombre de prises quotidiennes en une prise plus espacée en augmentant la demi-vie des molécules thérapeutiques en circulation. Dans ce sens, les résultats de l'étude HPTN 083 (phase 2) a démontré que l'injection par voie IM de cabotegravir à 8 semaines d'intervalles chez des sujets à risques hommes et femmes permettait de réduire de façon efficace la probabilité d'infection par le HIV-1 et serait 69% plus efficace que la prise quotidienne de Truvada® [174]. Cette plus faible efficacité du Truvada® est probablement due aux difficultés de suivi des personnes. Le cabotegravir est très bien toléré et présente peu d'interaction avec d'autres drogues. Une étude clinique de phase 3 est en cours, et permettra de confirmer l'efficacité de ce protocole.

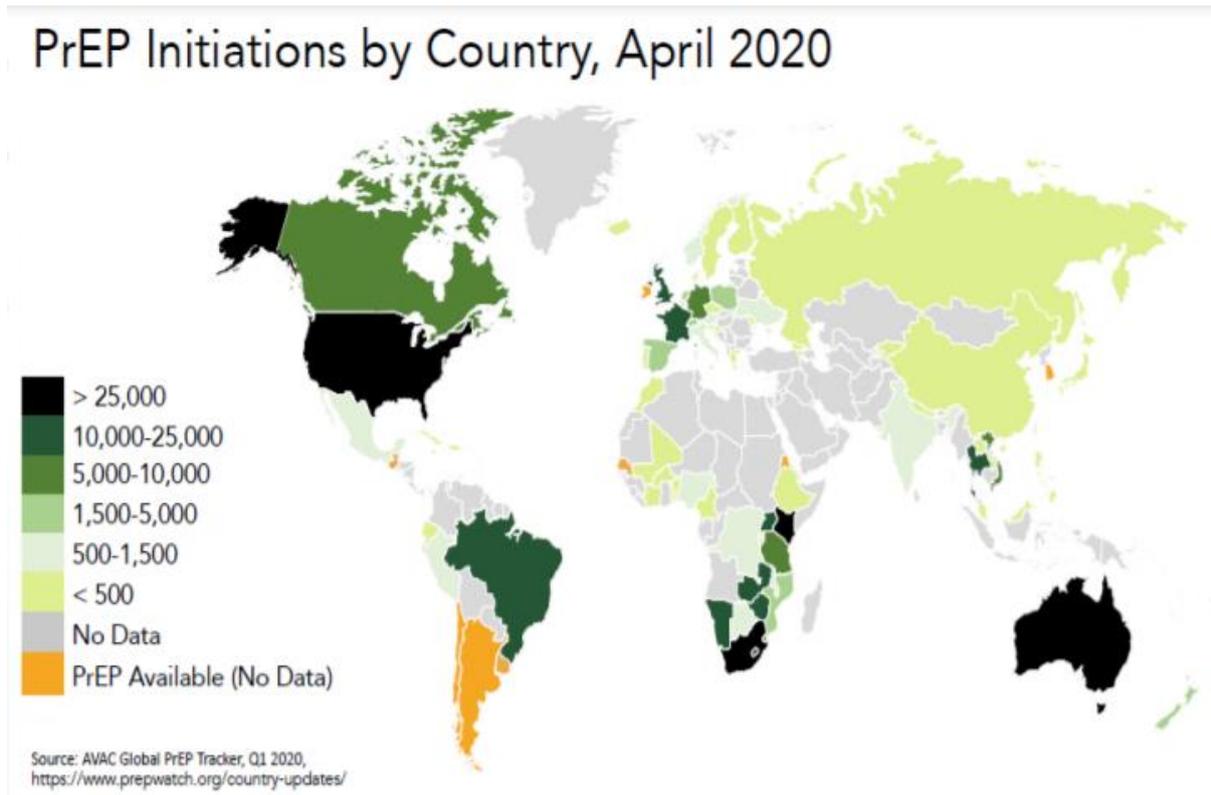


Figure 17 : Population ayant accès à la PrEP dans le monde en 2020.

2) La vaccination

Les vaccins constituent une des découvertes les plus importantes dans la lutte contre les maladies infectieuses aiguës et chroniques. Selon le NIH, ils permettent l'éviction de 2 à 3 millions de vies chaque année, depuis les premiers travaux de Bernoulli, Jenner puis Pasteur. La vaccination a permis l'éradication de la variole, et la réduction de 99% des infections de poliomyélite depuis 1988, passant de 350 000 à moins de 33 cas à la fin de 2019 selon les sources de l'OMS.

Le principe même de la vaccination est d'administrer des antigènes composés de toute ou partie de l'agent pathogène rendu inoffensif pour le receveur. La vaccination mime une primo-infection dans le but d'induire une reconnaissance des antigènes de l'agent pathogène par l'organisme et induire sa mémorisation. Ainsi, lors d'une infection par l'agent pathogène virulent, les cellules mémoires spécifiques mises en place lors de la vaccination vont réagir très rapidement, en très grand nombre pour contenir l'infection. Un des points critique de la vaccination repose sur son efficacité et sa capacité à conférer une réponse immune durable (réponse mémoire). Ceci en plus de l'aspect sécuritaire, qui se traduit par l'absence de pathogénicité et d'effets secondaires importants.

Différentes stratégies de vaccination ont été mises au point et testées à plusieurs niveaux. Ces différentes stratégies sont choisies en fonction du type de réponse recherchée, soit à base d'anticorps neutralisants, soit à base de cellules T cytotoxiques, soit encore la combinaison des deux réponses. La complexité de l'infection par HIV-1 et la pathogénèse induite ont nécessité l'essai de l'ensemble des stratégies vaccinales connues à ce jour, dans l'espoir d'induire une immunité protectrice de longue durée (**Figure 18**).

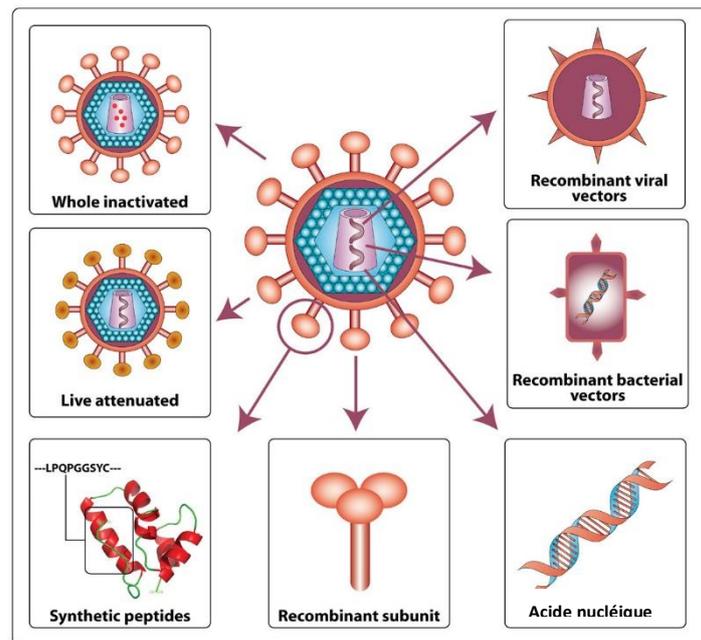


Figure 18 : Les différents types de stratégies vaccinales (d'après [175])

a) Les vaccins vivants atténués

Les vaccins qui se sont révélés être les plus efficaces lors des essais précliniques pour induire une immunité protectrice et reproductible restent à ce jour les vaccins vivants atténués. Pour rendre le virus inoffensif il faut d'une part, diminuer ou abolir sa virulence et d'autre part, empêcher la persistance de sa réplication. La méthode classique d'atténuation de la virulence virale consiste en des passages en série sur des cultures de cellules d'une espèce différente, ou le plus souvent par inoculation directe d'embryons de poulets. Après plusieurs passages, le virus s'adapte à la nouvelle espèce en subissant des altérations génétiques qui entraînent une perte de sa virulence et de ce fait l'absence de pathogénicité pour l'espèce cible du vaccin. L'utilisation d'un virus entier atténué permet de mimer les différentes étapes de l'infection, entraînant une production antigénique constitutive et similaire à celle induite lors de

l'infection par le virus pathogène et ce, à coût réduit de production. Cependant, l'utilisation d'agent pathogène vivant requiert une évaluation sérieuse des risques et particulièrement la réversion vers un phénotype plus virulent.

Cette réponse protectrice conférée par l'injection de souches vivantes atténuées est reproductible chez le macaque contre les souches pathogènes du SIV et du virus chimérique SHIV. En effet, l'injection du SIV délété du gène *nef* chez des macaques adultes engendre la protection contre l'infection avec un virus d'épreuve virulent [176].

Cependant, ces vaccins ont été exclus de l'utilisation en phases cliniques chez l'homme pour des raisons de sécurité. En effet, il a été montré que les nouveau-nés de macaques et certains macaques adultes vaccinés avec ce type de virus atténué, développaient une virémie élevée et persistante qui les rendait malades [177]. Cette infection était associée à l'intégration irréversible du génome du vaccin dans celui des cellules hôtes, conférant la capacité de réversion vers un phénotype pathogène.

b) Les vaccins entiers inactivés

Le virus est inactivé soit par la chaleur, soit par des procédés chimiques tel que le formaldéhyde. Ainsi, le virus va garder sa structure tridimensionnelle, permettant une reconnaissance de l'ensemble des Ag avec une conformation comparable avec celle du virus sauvage. Cette reconnaissance a lieu en l'absence de réplication virale. Si la procédure d'inactivation est correctement réalisée, ce processus est irréversible, avec absence de production de formes virulentes. En revanche, du fait de leur incapacité à se répliquer, ces vaccins sont moins immunogènes que les vaccins vivants atténués. Il est donc nécessaire d'ajouter des adjuvants et/ou de réitérer les injections pour conférer une protection efficace chez le vacciné. Dans le contexte de l'infection par HIV-1, les essais cliniques comme les essais précliniques chez les PNH ont montré une faible immunogénicité et l'absence de protection contre l'infection par les virus pathogènes. [178]

c) Les vaccins sous-unitaires protéiques

Ces vaccins sont composés de fragments protéiques du pathogène. Ces protéines sont en général recombinantes et sont fragmentées suite à leur administration, et les peptides antigéniques sont présentés au système immunitaire pour développer des réponses spécifiques. Un des inconvénients de cette stratégie vaccinale est la faible immunogénicité des protéines nécessitant l'utilisation d'adjuvants et des injections répétées afin d'augmenter les réponses immunes spécifiques. Des prototypes vaccins utilisant cette technique très sécuritaire

ont été utilisés contre l'infection HIV-1 utilisant des glycoprotéines d'enveloppes recombinantes. Cette stratégie a permis le développement d'anticorps neutralisants protecteurs chez le chimpanzé, mais s'est avérée inefficace chez l'homme lors d'essais cliniques [179].

d) Les vaccins à base de particules vides : Virus-like particule (VLP)

Les VLP sont des structures virales vides composées de protéines d'enveloppes du virus autour de la capsid mais sans matériel génétique, et donc non-infectieuses et incapables de réplication. Elles possèdent néanmoins la capacité de fusionner avec la membrane des cellules de l'hôte et d'internaliser les protéines de la capsid. Ce processus qui mime l'infection par le virus pathogénique, va activer l'immunité innée puis à la suite de la présentation de l'antigène par le CMH de classe I et II, va induire des réponses cellulaires et humorales sans nécessiter l'ajout d'adjuvants.

Plusieurs prototypes ont été développés, soit en utilisant les protéines trimériques d'enveloppe du HIV-1 testés sur le modèle souris [180], soit en produisant des particules basées sur les antigènes de la capsid Gag. Gag est connu pour stimuler fortement les réponses T cytotoxiques et des Ac spécifiques non neutralisants [181].

Afin d'accroître l'immunogénicité et d'élargir l'éventail d'épitopes disponibles, de nouvelles générations de VLP ont été développées en insérant des épitopes immunogènes tels que le peptide portant la portion de l'enveloppe MPER [182] ou la région CD4bs ; et dans un second temps, des trimères de glycoprotéines d'enveloppe. Ces stratégies permettent l'induction d'AcN, ainsi que la reconnaissance de souches plus diverses [181].

e) Les vaccins à vecteur viral

Ces vaccins sont à base du génome d'un virus vecteur pour lesquels l'activité répliquative a été en partie ou totalement inhibée. Les gènes codant pour les protéines immunogènes du vaccin sont introduits dans le génome du vecteur. Ces vaccins sont connus pour induire des réponses cellulaires fortes. Ces réponses sont de plus en plus recherchées depuis qu'il a été montré que les cellules T CD8 cytotoxique pourraient corrélérer avec le contrôle du HIV-1 chez les PNH comme chez les LTNP.

Les vecteurs viraux candidats pour un vaccin contre HIV-1 peuvent être de deux types. Des virus naturellement incapables, ou faiblement capables de réplication dans les cellules de mammifères. C'est le cas par exemple du poxvirus aviaire "canarypox". La deuxième

possibilité est d'utiliser des virus génétiquement modifiés et rendus incompetents ou faiblement compétents pour la réplication. Un exemple bien connu est celui des vecteurs adénoviraux, ou encore du poxvirus vaccin Ankara modifié (MVA). Dans ce sens, l'Adénovirus 5 (Ad5) a été testé en phase clinique 3, et a montré une immunogénicité particulièrement élevée [183].

f) Les vaccins à acide nucléiques

- Les vaccins ARNm

La technologie des vaccins à ARN n'a été que très récemment utilisée comme produit de première urgence chez l'homme depuis l'état d'urgence déclaré lors de la pandémie de CoViD-19. Ces vaccins ont été mis en première ligne du fait de la rapidité de production, ainsi que pour leur sécurité et leur efficacité à induire des réponses humorales et cellulaires. Ces vaccins peuvent être administrés sous différentes formes :

(i) les ARN conventionnels, où l'entrée de l'ARN à l'intérieur du cytoplasme des cellules musculaires va résulter en la production transitoire des protéines vaccinales d'intérêt. Brièvement, les ribosomes vont être assemblés autour de l'ARNm, puis recruter les ARNt pour assurer la traduction protéique. L'ARN va ensuite être rapidement dégradé par les nucléases cellulaires.

(ii) les ARN auto-amplifiés (saRNA, pour self-amplifying RNA). Ces derniers permettent d'accroître le nombre d'ARNm afin d'augmenter la quantité d'antigènes produits. Ces ARN auto-amplifiés sont obtenus grâce à l'ajout d'une séquence de réplicase nsP provenant du génome des Alphavirus, et placée en amont de la séquence vaccinale d'intérêt. Ainsi, un complexe d'ARN et de polymérase dépendante de l'ARN (RdRP) sera formé *in situ* et permettra l'amplification de la séquence ARN vaccinale, avant sa traduction [184]. Dans ce sens, une étude s'intéressant à un vaccin saRNA contre la grippe a comparé deux plateformes vaccinales, l'une de type ARNm, l'autre saRNA. Des niveaux de protection équivalents ont été induits avec des quantités plus de 60 fois inférieures pour le saRNA comparées à celle de l'ARNm (80 µg d'ARNm, comparés à 1.25 µg saRNA) [185].

Parmi les limitations des vaccins à base d'ARN, on peut noter leur fragilité liée à une dégradation par les RNases, leur immunogénicité plus faible chez les primates, et leurs

conditions de stockage et de distribution nécessitant la chaîne de froid. La stratégie de saRNA permet donc d'augmenter leur antigénicité, de même que d'autres stratégies non citées. L'encapsulation d'ARN dans des nanoparticules lipidiques (LNP) permet de les protéger des dégradations, augmente leur transfert dans les cellules cibles et agit comme adjuvant.

Pour HIV-1, un prototype saRNA codant pour la gp120 du HIV-1 (eOD-GT8) associé aux LNPs a été mis au point afin d'induire la production d'anticorps neutralisants à large spectre de type VRC01, en s'auto-assemblant et en stimulant des cellules B de lignée germinale. Des essais chez les souris injectées avec le saRNA exprimant le BCR humain, ont montré la production de cellules B germinales capables de mutations hyper-somatiques à la fois sur les chaînes lourdes et légères, menant à la production efficace d'anticorps neutralisants à larges spectres tels que VRC01 [186]. Ces essais ont également donné des résultats encourageants chez le modèle PNH, et ils sont actuellement en essai clinique de phase I (IAVI G001) chez un petit groupe de 48 participants. Cette étude a démontré une capacité à produire des anticorps à large spectre de type VRC01 chez 97% des sujets vaccinés [187].

- Les vaccins ADN

Les vaccins ADN tout comme les vaccins ARNm, représentent une approche très intéressante pour mimer une réplication virale par la production d'antigènes endogènes *via* la machinerie cellulaire, et permettre leur présentation par les cellules spécialisées. Les avantages sont nombreux du fait qu'ils sont non-infectieux, rapides et relativement aisés à produire, induisent des réponses humorales et cellulaires... De plus, contrairement à l'ARNm, l'ADN est connu pour être une molécule très stable, offrant la possibilité de les stocker et de le distribuer en absence de chaîne du froid. Ce dernier point peut être un avantage de taille pour la vaccination dans de nombreux pays ne disposant pas d'infrastructures adéquates pour le transport et le stockage dans des conditions de conservation à basses températures. Actuellement, un seul vaccin ADN a été approuvé pour son utilisation chez l'homme en lien avec l'urgence due à la pandémie de SARS-CoV-2 [188]. En revanche, quatre vaccins ont été approuvés en médecine vétérinaire par la FDA (Food Drugs Administration) et l'USDA (United States Department of Agriculture), contre le virus West Nile chez le cheval, contre le mélanome chez le chien [189], et également chez le saumon et le poulet.

Il n'existe pas ou peu d'immunité préexistante liée à ce type de vecteur. Les vaccins à ADN induisent une réponse immunitaire de longue durée, majoritairement cellulaire de type Th1, avec en particulier des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Cette caractéristique est due en

partie aux séquences CpG immuno-stimulatrices, induisant des réponses innées et adaptative *via* le TLR-9, menant à la production de cytokines telles que TNF- α , ou INF- γ [190]. Après immunisation par ADN, trois mécanismes de présentation de l'antigène sont généralement mis en jeu (**Figure 19**):

- (i) La présentation de l'Ag par les cellules somatiques transfectées lors de la vaccination (cellules musculaires, fibroblastes, kératinocytes...).
- (ii) La transfection directe des CPA professionnelles (telles que les cellules dendritiques) puis la présentation des Ag exprimés.
- (iii) La présentation croisée : les cellules somatiques ou les CPA sont transfectées par l'ADN vaccinal et les protéines secrétées sont prises en charges par d'autres CPA pour les présenter aux cellules T naïves. Les corps apoptotiques des cellules transfectées constituent aussi des cibles de présentation par les CPA.

De ce fait, la production des antigènes viraux par les cellules transfectées va impliquer la présentation des antigènes aux cellules T CD8 *via* le CMH-I et la voie du protéasome, alors que la prise en charge par les CPA professionnelles va induire à la fois une réponse CMH-I et CMH-II, menant à l'activation des cellules T CD4.

Plusieurs études ont également démontré que l'immunisation par un vaccin ADN permettait de conférer des réponses anticorps. Ces réponses sont dépendantes du type de protéines exprimées (solubles/insolubles), mais aussi du type de plasmide vecteur. L'expression d'au moins Gag et Env du HIV-1 va permettre l'assemblage en particules pseudo-virales qui pourraient mener à l'induction de réponses humorales et des anticorps neutralisants [191].

Ces vaccins se sont avérés sécuritaires et non associés à des réponses immunitaires antérieures lors des essais pré-cliniques et cliniques [192]. En revanche, leur immunogénicité chez les PNH et chez l'homme ne suffit pas à induire une protection durable contre les souches pathogènes. Cette faible immunogénicité peut être expliquée par une faible efficacité d'incorporation de l'ADN vaccinal dans les cellules, menant à un faible taux d'expression des antigènes. Par conséquent, il y aura une faible prise par les CPA, présent en rare proportion dans les muscles, lors d'injection intramusculaire. Dans ce sens, pour augmenter cette incorporation et présentation, la voie d'injection peut être changée par une voie plus adaptée. La voie intradermale a été utilisée pour sa richesse en CPA professionnelles comme les cellules de Langerhans (des cellules dendritiques sentinelles de la peau), et des macrophages résidents.

Le défi principal est de trouver des solutions pour augmenter d'avantage l'immunogénicité de ces vecteurs. Différentes stratégies ont été mises au point pour améliorer l'immunogénicité des vaccins à ADN :

- (i) L'injection répétée du même vaccin (homologue) ou l'administration de rappels avec des préparations vaccinales différentes (hétérologues) telles que des protéines ou virus recombinants. Pour des pathogènes tels que HIV-1, il a été suggéré qu'un rappel hétérologue serait plus immunogène et préférable afin d'optimiser la réponse immunitaire induite [193]. Des combinaisons différentes ont été testées avec des vaccins ADN comme agents de primo-immunisation, et des vecteurs comme le MVA, l'Adénovirus, le VSV, ou encore des protéines pour le rappel vaccinal. Une de ces stratégies prime-boost a été expérimentée en essai clinique de phase 1 avec trois injections de plasmides multi antigènes à 0, 1 et 3 mois, exprimant *gag/pol*, *env*, *nef/tat/vif*, suivi d'un boost à 6 mois avec un vecteur VSV exprimant le gène *gag*. Ce schéma de vaccination a permis l'induction de cellules T CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène Gag, et un maintien des LT CD8 6 à 9 mois après le boost. L'injection primaire avec un vecteur ADN a permis d'améliorer considérablement les réponses au vecteur VSV et d'induire et de maintenir la réponse en cellules T CD8 mémoires sur le long terme [193].
- (ii) Un autre type d'optimisation des vecteurs a été réalisé en coexprimant la protéine E2 du papillomavirus bovin avec les antigènes vaccinaux, permettant ainsi d'allonger la durée de vie de l'ADN dans les cellules pendant la division [194]. Ceci a permis d'améliorer la production des antigènes vaccinaux au cours du temps, et donc une stimulation plus importante de la réponse immune [195].
- (iii) En optimisant la prise en charge par les CPA : un vaccin ADN codant pour la protéine Gag-p24 du HIV-1 couplé au récepteur soluble sPD-1 a montré une augmentation des cellules T CD8 et CD4, ainsi que des titres d'anticorps spécifiques chez la souris. En effet, sPD-1 cible les cellules dendritiques porteuses du PD-L et ainsi, amorce directement la présentation de Gag p24 à ces cellules [196].
- (iv) En modifiant le mode de délivrance : il est maintenant bien établi que la peau peut être un organe de choix pour la délivrance des vaccins. Par exemple, la peau humaine peut contenir jusqu'à 1000 CPA/mm² [189]. L'injection est moins invasive et mieux tolérée que la voie intramusculaire et sa surface est très développée et accessible. Ainsi,

l'injection intradermale permettra la présentation croisée des antigènes vaccinaux, la production de cytokine *in situ* et l'induction de la prolifération et différenciation des cellules T et B naïves après migration dans les ganglions lymphatiques drainants. Un essai clinique (HVTN 098) a évalué si l'injection de 1/5 de la dose du vaccin PENNVAX-GP par la voie ID/électroporation (EP) pouvait éliciter une réponse immunitaire équivalente à la voie IM/EP. La magnitude des IgG Env-spécifiques était plus importante après injection par la voie ID. L'injection ID a donné des réponses équivalentes ou supérieures à celle IM pour une dose 5 fois moins importante, démontrant l'augmentation de l'immunogénicité de l'ADN par cette voie [197].

- (v) Par la co-expression d'adjuvants ou l'amélioration des techniques d'administration pour augmenter l'efficacité des transfections *in vivo*. Une des techniques les plus communément utilisées est l'EP. Cette dernière consiste en la délivrance d'un courant électrique permettant de rendre les cellules perméables et ainsi favoriser l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la cellule. Habituellement, une première impulsion dite de haut voltage (HV) est appliquée au site de l'injection afin de créer temporairement des pores dans les membranes cellulaires. Dans un second temps, plusieurs impulsions de voltages plus modérés (LV pour Low voltage) suivent afin d'internaliser l'ADN à l'intérieur des cellules. Il a également été montré que l'EP permettait d'engendrer une inflammation locale, recrutant des cellules inflammatoires. Ces cellules vont sécréter des cytokines jouant un rôle dans la prise en charge de l'antigène et de sa présentation, ainsi que pour l'activation des lymphocytes. Ainsi une étude réalisée chez des macaques avec le vaccin ADN auxoGTUmultiHIV combiné à l'EP a permis de montrer l'augmentation des cellules T CD4 et CD8 polyfonctionnelles, le recrutement de granulocytes et macrophages au site d'injection, ainsi que la maturation des cellules de Langerhans [198]. Ces modifications affecteraient la localisation ainsi que l'intensité de la production de l'antigène vaccinal sous la peau. Elles accroîtraient la mobilité des cellules de Langerhans, facilitant ainsi leur interaction avec les cellules productrices d'antigènes et leur migration. Ainsi, l'antigénicité du vaccin ADN et les réponses immunes induites seraient augmentés [198]. L'EP a également été testé chez l'homme afin d'évaluer sa tolérance et les effets secondaires éventuels. Lors de l'essai clinique HVTN 098, un groupe d'adultes sains a reçu par la voie IM/EP ou ID/EP le vaccin ADN PENNVAX®-GP codant pour les gènes *env*, *pol* et *gag* du HIV-1. Bien que la voie IM/EP ait été reportée comme plus douloureuse comparé à l>ID/EP, ces

deux méthodes d'immunisation se sont montrées sécuritaires, tolérables et jugées acceptables par la plupart des participants [199].

Des questions se sont posées quant à la possibilité d'intégration de l'ADN vaccinal au sein du génome des cellules hôtes. Une étude menée par Wang et collaborateurs, a permis de montrer qu'après l'injection IM/EP, le taux de transfection de l'ADN vaccinal était augmenté, associé avec un faible niveau d'intégration chromosomique du vecteur. En revanche, cette fréquence d'intégration était inférieure à celle des mutations spontanées survenant naturellement chez l'homme [189].

- Un candidat vaccin composé d'ADN plasmidique (pADN) a suscité un fort intérêt : le DermaVir. Ce plasmide code pour 15 antigènes du HIV-1 (clade B), capables de s'associer en pseudo-virions non-infectieux et non-réplicatifs, pour l'induction d'une réponse cellulaire Th1. Ce vaccin thérapeutique avait pour but de renforcer l'immunité cellulaire spécifique du HIV-1 chez les sujets séropositifs et ainsi, contrôler la réplication du virus et conduire à une guérison fonctionnelle. Pour cela, les cellules dendritiques (DC) et plus particulièrement les cellules de Langerhans, ont été choisies comme cellules cibles pour assurer la capture, le transport vers les nodules lymphatiques drainants et la présentation des antigènes. Afin de cibler ces cellules retrouvées en quantité très élevée dans le derme, le vaccin ADN est appliqué à l'aide d'un patch sur la peau préalablement exfoliée. Cette technologie sans aiguille permet l'activation des cellules de Langerhans et la prise en charge efficace des nanoparticules pADN. En effet, il a été montré chez les PNH qu'environ 20.000 DC exprimaient les antigènes d'intérêt dans le ganglion lymphatique drainant par cette technique [200], contre seulement 50 à 100 cellules chez la souris après injection par la technique gene gun [201]. La tolérance et la sécurité de ce prototype ont été testés lors d'immunisations répétées de souris et de lapins et n'ont montrés aucun effet indésirable, excepté la présence d'érythèmes dus à l'exfoliation de la peau. Cette légère inflammation est néanmoins indispensable pour entraîner l'activation et le recrutement des cellules de Langerhans [202]. Également, la preuve du concept a été étudiée chez les macaques infectés par une souche de SIV_{mac251} et en présence ou non d'un traitement ART. Les résultats ont montrés la présence de cellules T précurseurs mémoires, ainsi que la réduction de la charge virale et un bénéfice pour la survie des animaux [203]. Les essais cliniques de phase I et II chez des patients séropositifs ont quant à eux confirmé la tolérance et la sécurité du vaccin à des doses comprises entre 0.1 et 0.8 mg d'ADNp [204], mais également l'immunogénicité, avec la présence de cellules T précurseurs mémoires spécifique du HIV-1 chez des patients sous ART et l'effet antiviral

chez des sujets ART naïfs, avec une réduction significative de la charge virale chez les patients ayant reçu 3 doses de 0.4 mg d'ADNp [205]. Les essais cliniques de phase III sont actuellement en cours en Russie. Ces travaux ouvrent la voie à d'autres études plus approfondies de prototypes ADN dans la lutte contre HIV-1.

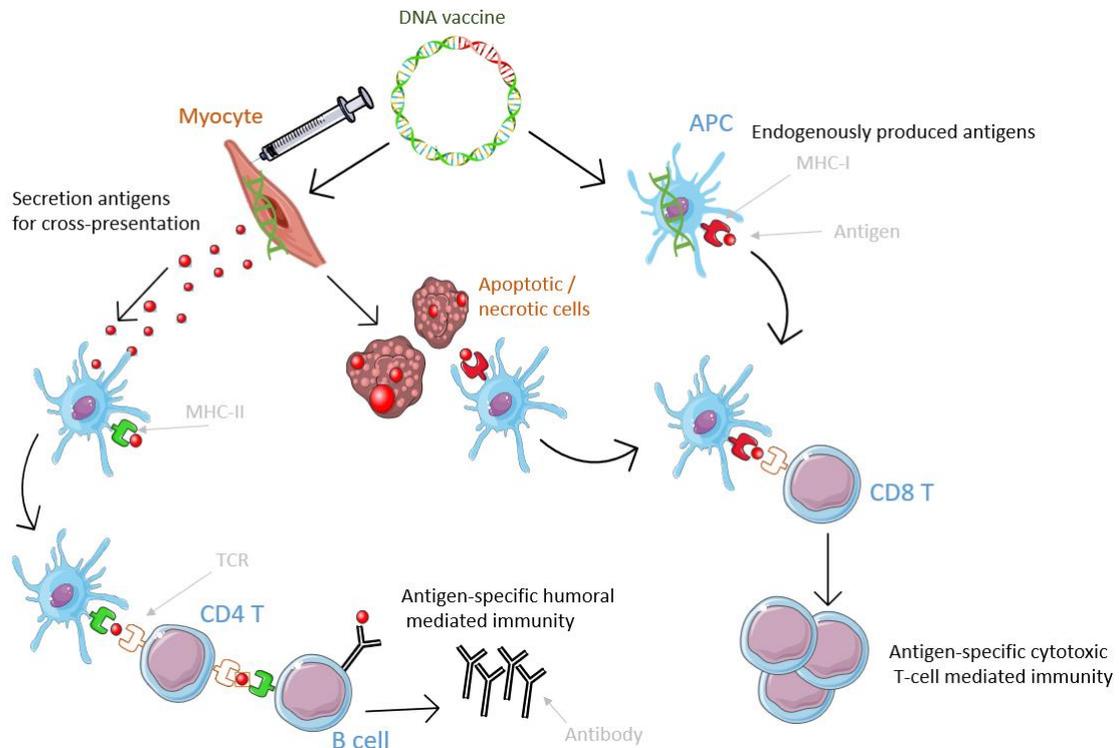


Figure 19 : Les différentes voies de stimulation après immunisation par un vaccin ADN.

3) Modèles animaux d'étude du HIV

Les modèles animaux ont permis d'approfondir notre connaissance sur un grand nombre de pathogènes, leurs mécanismes d'actions ainsi que la démonstration de l'efficacité de candidats vaccins et de molécules thérapeutiques. Le choix du modèle doit être judicieux, et ainsi être capable de mimer le développement, les symptômes et les modes d'actions d'une pathologie humaine.

a) Le modèle murin

Du fait de leur forte homologie génétique, les mammifères sont largement utilisés en recherche. Par exemple, la souris (*Mus musculus*) possède 95% de gènes homologues à l'homme [206]. Ce modèle présente de nombreux avantages. Il est disponible en grande quantité, facile à élever et peu coûteux, nécessitant un minimum de place, et possède un cycle de reproduction rapide. Il est également aisé de les manipuler génétiquement, afin de créer des lignées d'études pour certaines pathologies (lignées consanguines, délétion et insertion de

gènes...). (**Tableau 3**). Ces caractéristiques permettent d'obtenir des résultats reproductibles ainsi qu'une force statistique élevée, permettant de valider ou non des tests de première intention.

Les souris BALB/c (pour Bagg Albinos) sont couramment utilisées pour l'étude de l'immunogénicité ou pour reproduire des maladies infectieuses. Ces souris développent une réponse de type Th2 plus facilement activée après immunisation. Un inconvénient majeur est néanmoins rencontré : ce modèle murin ne permet pas l'infection ni la réplication du HIV-1, dû à l'absence de récepteurs à la surface des cellules et de facteurs de restrictions.

Pour pallier à ce problème, différentes lignées dites humanisées ont été établies grâce à de nombreuses mutations génétiques, permettant de les rendre immunodéficientes et mieux tolérantes à la greffe des cellules immunitaires humaines. Ces souris sont capables de récapituler au mieux les réponses immunitaires humaines, après greffe des cellules ou tissus humains.

- Les souris hu-PBL-*SCID*:

Des souris *SCID* (pour Severe Combination Immuno Deficiency) présentant un défaut de maturation des lymphocytes T et B par un défaut de réarrangement de leurs TCR et BCR, mais ne sont pas déplétées des cellules Natural Killer. Elles sont injectées par voie intraveineuse avec des PBMC humains pour l'humanisation. L'avantage de ce modèle est la possibilité d'établissement relativement rapide de la lignée humanisée, mais le manque de cellules B et de cellules myéloïdes, ainsi que la forte possibilité de rejet du greffon compliquent son utilisation. Ce modèle est préconisé pour les études généralement courtes (< 3 mois) en raison de ces paramètres [207].

- NOD-*SCID*

Le transfert de la mutation *scid* dans des souris Non-Obese Diabetic (NOD) a mené à l'établissement de la lignée NOD-*SCID*, déficiente pour les lymphocytes T, B et les cellules NK. Pour aller plus loin, une mutation dans l'*IL-2R α* a été introduite, créant les souris NSG (ou NOG) et entraînant un défaut dans les cytokines murine IL-2, -4, -7, -9 et -15. Egalement, l'extinction du gène *RAG* permettant une reconstitution légèrement supérieure des cellules humaines par absence des cellules T, B, NK, des macrophages et des cellules dendritiques.

Plus tard, les transgènes du système HLA classe 1 et 2 ont été ajoutés, permettant aux cellules T greffées de reconnaître les CPA humaines et d'induire des réponses.

- Les souris hu-SRC-SCID (SRC pour scid-repopulating cell) :

Cette lignée est humanisée après injection de d'une souris SCID immunodéprimée par cellules CD34+ provenant soit de sang de cordon ombilical, de moelle osseuse ou de foie de fœtus humain. Les cellules souches hématopoïétiques ainsi injectées pourront alors se différencier après un minimum de 10 semaines et permettront l'établissement d'un système immunitaire naïf.

- Les souris BLT (pour Bone marrow/Liver/Thymus),

Il s'agit de la lignée murine qui semble être la plus fidèle pour l'étude du HIV-1. Elle mime le système mucosal humain et permet l'étude de la transmission vaginale et rectale ainsi que l'évaluation des procédures thérapeutiques ou prophylactiques associées à l'élimination du HIV-1. Également, après greffe, ces souris possèdent des cellules T humaines fonctionnelles et matures capables de reconnaître l'antigène par le biais des CPA. Ces rongeurs sont transplantés au niveau de la capsule rénale avec des cellules de thymus et de foie, et injectées avec des cellules souches hématopoïétiques de foie fœtal. Bien qu'elles aient peu de cellules B du à un développement incomplet, les souris BLT ont un système immunitaire humain presque complet et fonctionnel, également capable de restriction par le CMH. Néanmoins, la possibilité de rejet de greffe, la difficulté d'injection du greffon ainsi que le temps de mise en place de la lignée (environ 11 semaines après greffe) en font un modèle peu accessible [208].

Tableau 3 : Caractéristiques de lignées de souris génétiquement modifiées.

	hu-PBL- scid	BLT	NOD-scid	NOG
Lymphocytes B matures	Non	Non	Non	Non
Lymphocytes T matures	Non	Non	Non	Non
DC	Oui	Faible	Faible	Faible
Macrophages	Oui	Faible	Faible	Faible
NK	Oui	Non	Non	Non
Esperance de vie moyenne	< 3 mois	9 mois	< 10 mois	> 18 mois

b) Le modèle Primate Non-Humain

En raison de leur proximité phylogénétique et génétique avec l'homme sur l'échelle évolutionnaire, autant sur le plan génétique, physiologique et au niveau de leur système immunitaire, les PNH sont considérés comme le meilleur modèle d'étude du HIV. Le chimpanzé a d'abord été un modèle de choix, étant donné sa plus grande proximité génétique avec l'homme (98% d'homologie de séquence). Il est capable de répliquer le virus humain puisqu'à l'origine, le HIV-1 provient du SIVcpz et il ne possède pas de facteurs de restriction de la réplication du virus. La progression de la maladie est extrêmement lente comme chez l'homme, et le coût d'entretien de ces animaux ont limité l'utilité de ce modèle. De plus, les chimpanzés ont été reclassés comme espèce menacée aux USA en 2015, ce qui empêche leur utilisation dans la recherche.

L'inoculation expérimentale du virus SIVsmm chez le macaque rhésus va entraîner l'apparition d'un syndrome d'immunodéficience similaire au SIDA chez l'homme infecté par HIV-1. De ce fait, les macaques sont devenus un modèle très répandu pour l'étude de la pathologie entraînée par l'infection SIV (**Tableau 4**). En effet, la compréhension des mécanismes sous-jacents à la progression de la maladie pourrait être transposées à l'infection par HIV-1 chez l'homme, et ainsi mettre en évidence les corrélats de protection de la maladie et les éventuelles pistes thérapeutiques.

Le macaque rhésus est devenu le modèle le mieux étudié, mais également l'un des modèles de référence pour l'étude du HIV-1 avec les macaques cynomolgus et pig-tailed. Lorsqu'ils sont infectés par la souche homologue SIV, les macaques vont reproduire les différentes phases aiguës et chroniques de l'infection et vont présenter de nombreuses similarités lors de la transmission du virus. Egalement, cette similarité est présente sur le plan de la dynamique entre l'interaction du virus et les cellules T CD4+, et la progression de la maladie et la formation du réservoir. En effet, comme chez les patients infectés par HIV-1, ces macaques présentent une charge virale élevée lors de l'infection aiguë, qui diminue ensuite avec le contrôle du virus par les LT CD8. Après la phase chronique, une nouvelle augmentation de la virémie est observée (de l'ordre de 10^4 - 10^7 particules/mL de plasma) lié à l'épuisement des cellules T CD8, la destruction massive des cellules T CD4+ et le dysfonctionnement des autres cellules du système immunitaire. La phase SIDA s'achève également par la mort de l'animal due à des infections opportunistes dans les 2 ou 3 ans après infection [209].

Tableau 4: Avantages et inconvénients de différentes espèces de macaques pour l'étude de l'infection par SIV

Modèle macaque	Avantages	Inconvénients
Macaques rhésus (<i>Macaca mulatta</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Modèles d'exposition par voie orale (bébés), intraveineuse, intrarectale, intravaginale et pénienne (dose élevée unique ou faible dose répétée). - Modèles de co-infection SIV/TB. - Profils alléliques du CMH bien caractérisés chez les macaques d'origine indienne. -Modèle de choix pour les candidats vaccins. 	<ul style="list-style-type: none"> -Acquisition de macaques rhésus indiens dépendant de la capacité d'élevage. -Macaques rhésus chinois : profils alléliques du CMH moins bien caractérisés, ne conviennent pas aux études sur les vaccins. -Reproducteurs essentiellement saisonniers : pénurie de macaques femelles, inadapté aux études comparatives SIV/SHIV liées au cycle menstruel.
Macaques pigtail (<i>Macaca nemestrina</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Ecologie, anatomie et physiologie vaginales similaires à celles des femmes. - Modèle de challenge intravaginal à faible dose répétée bien caractérisé. - Modèles de co-infection SIV/SHIV et IST. - Semble prometteur en tant que modèle de macaque utilisant le HIV - Neuro-SIV 	<ul style="list-style-type: none"> - Infections à SIVmac généralement agressives, ne reflètent pas une infection par HIV-1. -Installations d'élevage limitées aux États-Unis, chères. -Modèle moins établi pour le test des vaccins candidats.
Macaques cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	<ul style="list-style-type: none"> -Plus petit en taille, plus facile à manipuler. -Largement disponible. -Les macaques d'origine mauricienne présentent une homogénéité élevée des allèles du CMH. 	<ul style="list-style-type: none"> - La taille plus petite limite le volume et/ou la fréquence des prélèvements de sang et d'échantillons. - Appropriation limitée pour les études sur les vaccins. - Modèle non optimisé pour les injections à faible doses répétées.

Les macaques rhésus sont souvent utilisés pour l'étude impliquant le réservoir viral ou les recherches de traitements, puisque l'infection est associée à une charge virale élevée, une déplétion progressive des LT CD4 et une activation chronique du système immunitaire. La virémie peut également être contrôlée mais pas éliminée par traitement ART, menant au rebond viral si celui-ci est interrompu [210]. Un des grands avantages de ce modèle est le temps avant déclaration de la phase SIDA : 2 à 3 ans chez le macaque contre une dizaine d'année chez l'homme. Ainsi la maladie peut être étudiée dans un temps plus restreint (Figure 20).

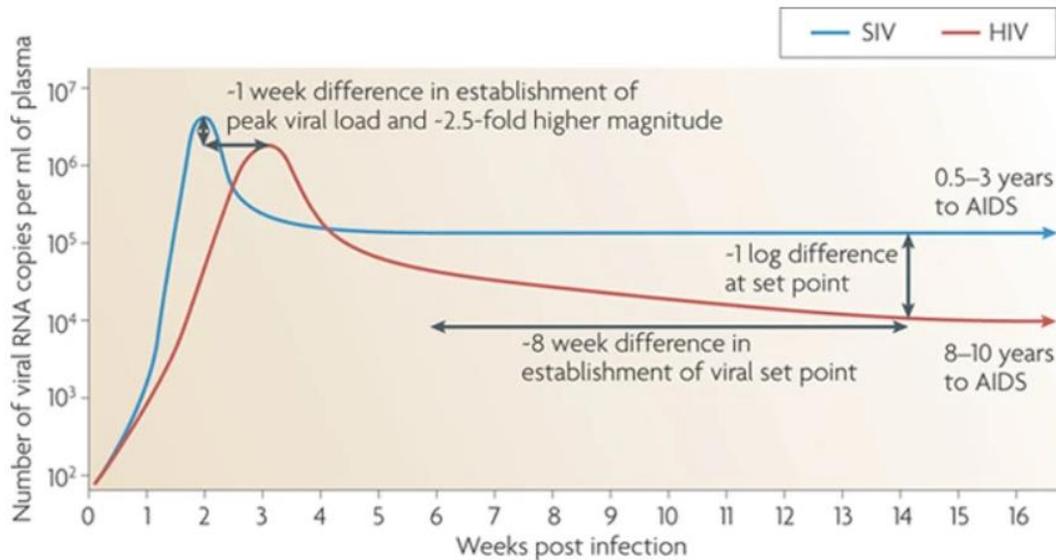


Figure 20 : Différence dans la cinétique virale chez le macaque rhésus (SIV) et chez l'humain (HIV) [211]

Les singes africains comme les Sooty mangabey et African green sont des hôtes naturels du SIV. Ils présentent une phase aiguë similaire à l'homme, mais ne progressent pas vers une phase SIDA et montrent une diminution minimale du taux de cellules T CD4+ périphériques. Cette différence d'évolution lors de la phase chronique serait due au niveau d'expression du corécepteur CCR5 : chez les singes africains, seules les cellules T CD4 effectrices présentent de hauts niveaux d'expression du CCR5, alors que pour les cellules mémoires, l'expression de ce corécepteur est restreinte, réduisant la capacité d'infection du virus aux cellules effectrices [212]. Néanmoins, cette théorie resterait disputée, et une activation immunitaire contrôlée chez ces singes resterait l'explication plausible.

Les modèles de pathogénie sont très variés en fonction de l'espèce de PNH, de la souche virale (par exemple SIV_{mac} – pour macaques, SIV_{sm} – pour Sooty magabey, mais également de leur différents clones moléculaires (SIV_{mac239}...)). En plus de ces paramètres, le profil génétique est également à prendre en considération, afin de déterminer la capacité de progression de l'infection. La caractérisation des allèles du CMH I permet de déterminer la susceptibilité à l'infection. C'est le cas de l'allèle *Mamu A*01* pour le CMH-I, qui permettrait aux macaques positifs de développer une infection significativement retardée, même avec une souche hautement pathogène telle que le virus chimérique SHIV_{89.6P} [213]. Ce délai de l'infection est induit par une réponse dominante des CTL, et traduit par une charge virale plus faible dans les nodules lymphatiques, minimisant ainsi leur destruction lors de la phase d'infection [213].

D'autres allèles appartenant au CMH-II ont également été caractérisés pour leur impact sur la progression de l'infection et associés à des résultats cliniques favorables (non-progression à long terme du virus). Les allèles *HLA-B*27* et *-B*57* notamment, permettent d'atténuer la susceptibilité à l'infection par HIV-1 par la médiation de réponses immunodominantes dirigées contre des épitopes de Gag p24, ainsi que par une forte réponse cytotoxique contre Rev, Env et Pol [214].

Afin de mimer les différents profils d'infection humaine, différentes voies d'injection ainsi que différentes souches virales peuvent être utilisées. Ainsi, la voie intraveineuse permettra de refléter l'infection humaine par les utilisateurs de drogues / contamination par des seringues et aiguilles usagées. L'inoculation par voie rectale ou vaginale sera privilégiée pour mimer une contamination lors de rapports sexuels, et la voie orale mimera la transmission de la mère à l'enfant lors de la naissance et l'allaitement.

5) Essais cliniques

De nombreuses stratégies vaccinales ont déjà été étudiées mais peu ont atteint les essais cliniques de phase IIb/III. On compte parmi eux l'étude AIDSVAX dans les années 90, dirigée par la société VaxGen. Cette stratégie vaccinale est basée sur l'immunisation à l'aide d'une protéine recombinante du virus, ici la protéine Gp120 monomérique recombinante issue des sous-types B et E du HIV-1, et adjuvé avec de l'alun. Ce vaccin a, entre autre, été testé en Thaïlande sur des sujets sains présentant un risque d'infection élevé. La protection repose sur la mise en place d'une réponse humorale, et plus précisément sur l'induction d'anticorps anti-Gp120 non-neutralisants. Les résultats de cet essai ont révélé qu'aucun sujet vacciné n'était protégé contre l'infection à HIV-1 et le vaccin n'a pas permis de retarder l'infection [215].

Un essai de phase IIb a également été conduit en 2004, HTVN 502 « STEP » par la société Merck. Ce vaccin est basé sur une stratégie de vecteur recombinant, ici composé de 3 vecteurs adénoviraux recombinants (Ad5) exprimant Gag, Pol ou Nef du sous-type B du HIV-1. Cet essai a dû être interrompu prématurément 3 ans après son lancement en raison d'une augmentation du risque d'infection chez les sujets vaccinés par rapport au groupe placebo. En effet, on estime qu'environ 90% de la population des pays en développement présente des taux élevés d'anticorps neutralisants (NAb) dirigés contre l'Ad5 [216]. Ainsi, l'injection de vecteur a entraîné la réactivation des lymphocytes T CD4 en raison de l'immunité antérieure contre Ad5, augmentant ainsi le nombre de cellules effectrices, cibles du HIV-1, et entraînant

un risque plus élevé d'infection chez les individus vaccinés. Malgré la réponse immunitaire élevée des lymphocytes T CD8 effectrices induite par le vaccin, aucun contrôle de la virémie n'a été observé [217].

Un des récents essais cliniques testés en phase III, RV144, repose sur une stratégie prime/boost. Il est composé d'un vecteur canarypox codant pour Gag, Pro et Gp41 en primo-injection (essai ALVAC) et du vaccin AIDSVAX en boost. Après 3 ans et demi de suivi, cette étude a montré une protection contre l'infection de 31% chez les vaccinés par rapport au groupe témoin. La mise en place d'anticorps non neutralisants IgG1 et IgG3 contre la région de l'enveloppe V1/V2 du virus, ainsi que des mécanismes d'ADCC / ADCP a été observé. Néanmoins, cette réponse immunitaire transitoire n'a eu aucun effet sur le ralentissement de l'infection ni sur le taux de lymphocytes T CD4 chez les sujets infectés [218]. Ce taux de protection induit par un vaccin est le plus élevé à ce jour, mais reste néanmoins insuffisant pour protéger les individus contre l'infection par le HIV-1. Pour cette raison, la nécessité d'une stratégie innovante est cruciale pour lutter contre cette infection chronique.

En février 2020 dernier s'est arrêté l'essai clinique Uhambo (HVTN 702), non pas pour des raisons de sécurité mais d'efficacité parce que ce vaccin n'induisait aucune protection contre l'acquisition du HIV-1 (129 personnes vaccinées infectées contre 123 chez le groupe placebo, 18 mois après le début de l'étude). Basé sur l'essai d'une stratégie similaire au RV144, ce vaccin était additionné d'un adjuvant différent (MF59) pour augmenter la réponse immunitaire ; et présentait des antigènes du HIV-1 de clade C, le sous-type plus représenté en Afrique ; ainsi qu'un schéma vaccinal renforcé. Cet échec peut être dû à l'utilisation du clade C, beaucoup plus hétérogène que le clade asiatique utilisé lors de l'essai RV144, entraînant des réactions immunes plus atténuées, ou encore de l'adjuvant induisant des cibles LT CD4 activés dans les muqueuses.

Autre point concernant le virus, sa forte prévalence dans l'entourage des sujets lors de l'essai en Afrique, contrairement à ce qui avait été constaté en Thaïlande. L'environnement culturel a également eu un impact, en effet, 50% des femmes et 70 % des hommes déclaraient avoir plus d'un partenaire [219].

Le concept de vaccins dits « mosaïques » s'est avéré révolutionnaire puisque le problème majeur pour l'éradication du HIV-1 est son immense diversité génétique, menant à un échappement immunitaire constant. Ils contiennent des gènes ou protéines synthétiques du virus développés *in silico*, provenant de différents clades et de souches afin de maximiser

l'immunité dirigée contre les séquences des virus circulant dans le monde [220]. Des études d'un prototype vaccinal mosaïque chez le macaque rhésus ont renforcé l'espoir dans cette stratégie vaccinale innovante, en montrant qu'une souche mosaïque pouvait élargir la gamme d'épitopes reconnus et augmenter la réponse dirigée vers des épitopes de variants. L'induction d'une réponse immunitaire robuste et protectrice après challenge par une souche de SHIV-SF162P3, avec induction d'anticorps et de cellules T dirigés contre l'enveloppe du HIV-1 Clade C a pu être révélée [221].

Ainsi, des essais cliniques de phase I/IIb ont été initiés, avec notamment les études APPROACH, ASCENT, TRAVERSE, conduit aux Etats-Unis, dans plusieurs pays d'Afrique ainsi qu'en Thaïlande. Ces essais ont conclu que le vaccin était sûr pour l'homme, et induisait des réponses immunitaires dirigées contre le vaccin. L'étude ASCENT (HVTN 118) a d'ailleurs démontré que la combinaison de vaccin mosaïque composé d'un vecteur Adénovirus sérotype 26 (Ad26) trivalent contenant les trois protéines du HIV-1 mosaïque Gag, Pol et Env en prime, puis boosté avec ce vecteur additionné des protéines trimériques gp140 clade C, donnait des réponses anticorps spécifiques de Env chez 100 % des vaccinés comparé à un vecteur ne contenant pas la gp140 [222]. Egalement, l'essai TRAVERSE, basé sur un vecteur Ad26 composé des trois protéines du HIV-1 mosaïque Gag, Pol et Env (vaccin tétravalent) injecté avec la protéine gp140 mosaïque en quatre injections, et additionnées des protéines trimériques gp140 du clade C adjuvanté d'alum lors des deux dernières vaccinations a montré que ce schéma vaccinal était amélioré lorsque deux types d'enveloppes mosaïques étaient utilisés [223]. Ces résultats ont donné de la visibilité et ouvert la voie à un essai clinique de phase III, Mosaico (HVTN 706), dont la fin est prévue pour courant 2024. Il est testé sur une cohorte de 3800 participants transgenres ou d'HSH, dans 8 pays, et déterminera si le vaccin est capable de protéger contre l'infection par HIV-1 [224].

6) Les adjuvants utilisés en vaccination

Les adjuvants sont définis comme des composants ajoutés aux vaccins afin d'améliorer la réponse immunologique. Ils ont de nombreux avantages tels que la réduction de la fréquence de vaccination, la réduction de la dose d'antigène par vaccin, améliorent et modulent la qualité de la réponse immunitaire et favorisent l'immunité inter-clades et dans certains cas, ils peuvent améliorer la stabilité de la formulation finale du vaccin.

Les adjuvants particuliers tels que l'alun, les émulsions, les liposomes et les microparticules peuvent être considérés comme la première génération d'adjuvants vaccinaux. Cette première génération peut également être considérée comme un vecteur d'antigène qui favorise l'absorption de l'antigène co-administré. La deuxième génération d'adjuvants vaccinaux peut être décrite comme des adjuvants combinatoires car ils sont composés de potentialisateurs immunitaires associés à la première génération d'adjuvants vaccinaux [225].

a) Les adjuvants à base d'alun

Depuis environ un siècle, l'aluminium est utilisé pour l'adjuvantation des vaccins sous forme d'hydroxyde d'aluminium ou de phosphate d'aluminium, chacun ayant une morphologie différente. Son interaction avec les antigènes vaccinaux se fait de façon électrostatique, en fonction du pH et du point isoélectrique. L'utilisation de l'alun permet à l'antigène vaccinal de rester plus longtemps au site d'injection. Il permet également d'engager une réponse humorale Th2 *via* des mécanismes peu connus mais présumés être dus à un recrutement des CPA, à l'activation de l'inflammasome, la libération d'ADN provenant de l'apoptose cellulaire entraînant la libération de signaux de danger, et la reconnaissance et phagocytose améliorée par les CPA [225].

b) Les émulsions

Elles sont composées d'un mélange d'huile et d'eau et de l'antigène. Un des adjuvants historique de cette catégorie est l'adjuvant de Freund, composé d'un mélange d'huile minérale, d'eau et de bactérie *Mycobacterium tuberculosis* tuée lorsqu'il est complet. La forme dite « incomplète » est également disponible, sans bactéries. Néanmoins, l'huile minérale contenue dans cette formulation est très peu biocompatible et très peu biodégradable, de ce fait, elle n'est plus utilisée chez l'homme. Depuis, des formules plus adaptées ont vu le jour comme le composé MF59, à base de squalène, une huile biocompatible, et de tween 80 dans un tampon de citrate de sodium. Cet adjuvant ne crée pas de dépôt au site d'injection et augmente l'influx de CPA et des cellules mononuclées, permettant d'augmenter la capture de l'antigène et sa présentation. Il permet également une libération de cytokines et chimiokines au site d'injection. L'ajout d'alpha-Tocophérol (vitamine E) au MF59 a donné l'AS03, utilisé dans les vaccins contre la grippe. Il a montré de fortes propriétés immuno-stimulatrices, avec le recrutement augmenté de monocytes et granulocytes au site d'injection.

c) Les adjuvants à base de lipides

Les liposomes sont des particules sphériques composées d'une bicouche de phospholipides et d'un centre aqueux. Les liposomes seuls n'induisent pas de fortes réponses immunes, ainsi ils

peuvent être utilisés combinés à d'autres molécules stimulant l'immunité. Les antigènes vaccinaux peuvent être additionnés aux liposomes sous différentes formes : encapsulés, associés à la membrane, ou adsorbés sur les liposomes avant injection. Cette combinaison est rendue possible grâce à la charge maintenue entre les deux composés (liposome cationique, neutre ou anionique)

Les adjuvants les plus utilisés en vaccination dans cette famille sont les complexes immuno-stimulateurs (ISCOMs, pour immuno-stimulatory complexes), où l'Ag est associé à des phospholipides, du cholestérol et du Quil-A ; ce dernier faiblement toléré a été remplacé par de la saponine. L'interaction des ISCOMs avec la membrane des cellules permet de délivrer l'Ag dans les cellules par le biais d'endosomes. Ces adjuvants sont généralement choisis pour leurs propriétés de mobilisation des CTL et le recrutement des cytokines et chimiokines.

d) Les microparticules de polymères

Les microparticules de PLG (pour poly(lactide-co-glycolide)) sont des composés biocompatibles et biodégradables connus pour libérer l'Ag lorsqu'il est introduit dans un environnement aqueux. En revanche, les conditions d'ancrage de l'antigène sont associées au risque de perte de sa stabilité, c'est pour cette raison qu'aucun vaccin commercialisé ne comporte cet adjuvant [226, 227]. Il a été montré qu'associé à un vaccin ADN, ce composé favorisait plutôt une réponse de type Th1 au détriment de Th2, avec une augmentation des LT CD8 [228].

De nombreuses controverses ont vues le jour suite à la toxicité possible des adjuvants, de leur élimination et persistance dans l'organisme. C'est le cas de l'aluminium dont le mode d'action est finalement peu connu [229]. Les risques d'auto-immunité, d'inflammation cérébrale à long terme et les complications neurologiques associées sont considérés. Ce sujet reste à ce jour controversé lié à un manque d'évaluation adéquate des doses utilisées, de la voie d'injection ou à l'exposition quotidienne. Pour cela, d'autres composés censés être moins toxiques et avec une meilleure biotolérance et biodégradabilité sont également testés pour leur propriétés immuno-stimulatrices ou leur capacité de transport et libération continue de l'Ag. C'est le cas des polysaccharides tels que l'inuline ou le mannose [230], de l'oxyde de graphène [231], ou encore de la flagelline bactérienne [232]. Egalement, des essais cliniques ont été conduits pour tester la capacité d'adjuvantation de composés naturellement présents dans l'organisme et connus pour leur rôle primordial dans le développement de l'immunité : les cytokines.

III. Les cytokines

Les cytokines jouent un rôle crucial dans la maturation de la réponse immunitaire et son développement. Deux cytokines majeures, l'IL-7 et l'IL-15, ont fait l'objet d'une grande attention pour leurs nombreux effets sur les cellules immunitaires. En effet, toutes les deux augmentent la prolifération et la fonction des lymphocytes T et régulent la génération et la survie des lymphocytes T CD8+ mémoires spécifiques des antigènes.

1) Interleukine 7 (IL-7)

L'IL-7, d'une taille de 17,5 kD, est produite par diverses cellules stromales, ainsi que par les kératinocytes, les cellules dendritiques, les neurones et les cellules endothéliales, mais pas par les lymphocytes.

Il est bien établi que cette molécule lymphopoïétique joue un rôle dans l'homéostasie des cellules thymiques et périphériques. Ces effets sont impliqués par la fixation de l'IL-7 sur son récepteur IL-7R α . Ce récepteur est composé d'un hétérodimère de la sous-unité IL-7R α spécifique de la chaîne IL-7 (CD127) et de la chaîne γ commune (γ c), partagée par de nombreuses cytokines comme l'IL-2 et l'IL-15 [233] (**Figure 21**). Le niveau d'expression d'IL-7R α est étroitement contrôlé pour optimiser la consommation d'IL-7 afin de maintenir l'homéostasie des lymphocytes T. Cette régulation permet de limiter l'expansion excessive des cellules activées, de maintenir un réservoir de cellules T naïves et de favoriser la persistance des cellules mémoire. L'expression de l'IL-7R α sur les cellules T est régulée négativement par la stimulation du TCR et de l'IL-7 : la transcription de l'IL-7R α est réprimée *via* des signaux induits par les cytokines comme IL-2, IL-7 et IL-15. En réponse à ces cytokines, l'expression de CD8 est augmenté à la surface des LT CD8+, ce qui réduit la signalisation de TCR/CD8 et diminuent l'expression et les signaux d'IL-7R α [234].

La régulation de l'expression d'IL-7R α est essentielle pour la génération du pool mémoire de LT CD8 et agit également sur les cellules précurseurs dans la moelle. Chez l'homme, le déficit en IL-7R α entraîne une immunodéficiences sévère et une absence totale de cellules T [233]. Chez la souris, une absence d'IL-7R α implique l'arrêt du développement des lymphocytes T au stade double positif et une lymphopénie sévère. L'administration d'IL-7 augmente les cellules T et conduit à leur récupération après une greffe de moelle osseuse. D'autre part, une surexpression d'IL-7 peut développer des troubles lymphoprolifératifs [235].

Lorsque l'IL-7 est administrée à des PNH, le pourcentage de cellules dans le sang augmente considérablement - en particulier le sous-ensemble de cellules naïves [236].

D'un point de vue moléculaire, les Janus kinases associées aux récepteurs (JAK), JAK-1 et JAK-3 sont activées à la suite de la stimulation d'IL-7R α et conduisent à la phosphorylation de STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)-1 et STAT-3 [237] (**Figure 21**).

IL-7 est surexprimée chez les patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde, et stimule l'activation des macrophages et des lymphocytes T, conduisant à une production élevée de TNF α et de métalloprotéinases dans le liquide synovial [238]. Chez les patients atteints de la sclérose en plaques, il a été démontré une surexpression de l'ARNm de l'IL-7 ainsi que de ses récepteurs IL-7R α [239].

2) Interleukine 15 (IL-15)

L'interleukine-15 (IL-15) est une protéine pro-inflammatoire de 14 kDa impliquée dans l'activation des neutrophiles, des cellules dendritiques et des macrophages. Elle est essentielle au développement et à la survie des cellules NK et à la prolifération homéostatique des cellules T CD8 mémoires. Cette cytokine est fortement exprimée dans le muscle squelettique et sécrétée par les monocytes/macrophages activés, les cellules dendritiques et les fibroblastes en réponse à un stimulus inflammatoire, et régule l'immunité innée et adaptative (**Tableau 5**).

Comme l'IL-7, l'IL-15 induit la prolifération et la chimiotaxie des lymphocytes T et stimule la production de cytokines [240, 241]

Chez l'homme et la souris, la présence de deux peptides signaux différents en amont du gène de l'IL-15 entraîne un épissage alternatif et la synthèse de deux isoformes d'IL-15 : un peptide signal long et un peptide signal court (LSP et SSP, respectivement). Ces deux protéines matures ont des profils de trafic, de localisation et de sécrétion intracellulaires différents. L'isoforme LSP est sécrétée par la cellule comme protéine soluble, tandis que l'isoforme SSP est séquestrée dans le cytoplasme et le noyau, suggérant son rôle de régulateur transcriptionnel [242].

L'IL-15 est capturée par les cellules exprimant le récepteur hétérotrimérique. Deux des sous-unités de ce récepteur sont communes avec le récepteur de l'IL-2 (IL-2R β - chaîne CD122 et

CD132, respectivement), tandis que la sous-unité CD215 est unique à l'IL-15 (IL-15 α - CD215).

Une des découvertes suggère qu'une forme alternative de l'IL-15R α pourrait être utilisée en l'absence de ce récepteur. Les LT CD8+ mémoire ont été générées chez les souris IL-15^{-/-} et IL-15R α ^{-/-}, et semblaient capables de répondre normalement après stimulation par les cytokines, mais la réponse immunitaire primaire chez les souris IL15^{-/-} était diminuée par rapport à la réponse normale chez IL-15R α ^{-/-}, suggérant la mise en place d'un relais [243].

Il est établi que l'IL-15 est présentée à la chaîne hétérodimère IL-2R β / γ c d'une cellule cible par les cellules activées telles que les CPA *via* l'IL-15R α . Ce processus est appelé trans-présentation [242].

Alors que l'IL-15 est sécrétée uniquement complexée à l'IL-15R α chez la souris, chez l'homme la sécrétion d'IL-15 a été observée non-complexée.

La trans-présentation de la cytokine IL-15 active les voies JAK/STAT, conduisant à la transduction du signal médiée par JAK-1 et JAK-3 dans les cellules exprimant IL-2R β /IL-15R α , telles que les LT CD8 mémoires. La phosphorylation de STAT-5 à la suite de l'activation de l'IL-7R α ou IL-15R α par leurs cytokines respectives, conduit à une meilleure survie par l'augmentation de la molécule anti-apoptotique Bcl-2, et à une prolifération accrue des lymphocytes T [242] (**Figure 21**).

Les souris qui présentent des perturbations génétiques sur l'IL-15, JAK-3 ou STAT-5 présentent un déficit profond en cellules lymphoïdes [244].

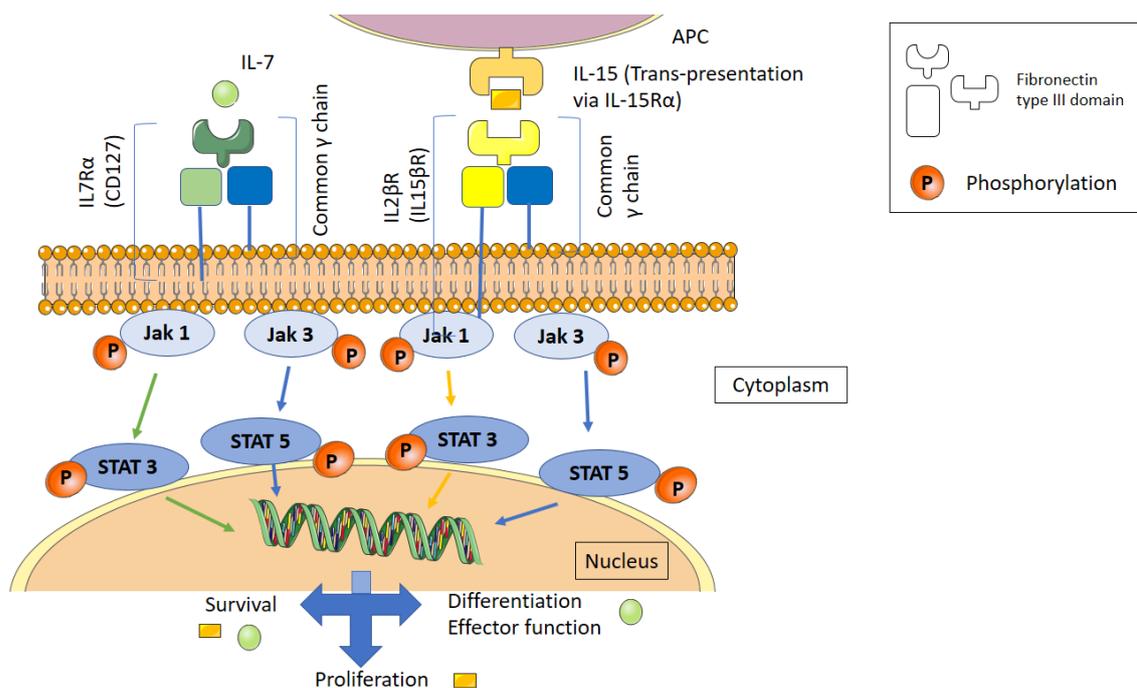


Figure 21 : Voies d'activations impliquées par l'interaction des cytokines IL-7 et IL-15 avec leurs récepteurs respectifs. L'activation du récepteur hétérodimérique par l'IL-7 induit l'activation de Jak-1 qui phosphoryle ensuite STAT-3 via la chaîne et l'activation de Jak-3/STAT-5 via sa chaîne. Après la présentation trans de l'IL-15 via une autre cellule portant l'IL-15Rα, le récepteur hétérodimérique de l'IL-15 est activé. La chaîne phosphoryle la molécule Jak-1 qui phosphoryle STAT-3, tandis que la chaîne phosphoryle la molécule Jak-3 qui phosphoryle STAT-5. Signaux intracellulaires conduisant à une translocation de noyau et à une survie induite (IL-7 et IL-15) avec l'activation de la transcription de la protéine Bcl-2, la prolifération (IL-15) et la fonction de différenciation et effectrice (IL-7)

Tableau 5: Production et rôle de l'interleukine 7 et 15.

Cytokine	Production	Role
IL-7	Cellules stromales non hématopoïétiques de la moelle osseuse, thymus, organes lymphoïdes, tissus lymphoïdes muqueux, peau et foie	Induit le développement, la prolifération et la survie des cellules T mémoire CD4+ et CD8+ Régulateur clé de la transition des cellules T effectrices vers les cellules T mémoire Survie à long terme des cellules T mémoire CD8
IL-15	Macrophages Cellules dendritiques Kératinocytes Cellules épithéliales	Induit la prolifération des cellules T Protège de l'apoptose Favorise la mémoire des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) Chimiotactique pour les lymphocytes T Stimule la prolifération des cellules épithéliales intestinales

3) IL-7 et IL-15 en thérapie

L'incorporation de cytokines comme adjuvants de vaccins a reçu une grande attention afin d'améliorer l'efficacité des réponses immunitaires induites.

Au vu de toutes les caractéristiques mentionnées précédemment, l'IL-7 et l'IL-15 semblent être de bons candidats pour augmenter le potentiel des prototypes vaccins contre HIV-1.

Pendant l'infection primaire par HIV-1, les taux d'IL-7 sont inversement corrélés au nombre de LT CD4 puisque la lymphopénie entraîne une diminution de l'utilisation d'IL-7, donc une disponibilité accrue [240, 245]. Néanmoins, il a été montré que l'administration de l'IL-7 recombinante chez des patients atteints de lymphopénie augmente sélectivement les LT CD4 et CD8, et diminue les cellules régulatrices T CD4 [235].

Chez les PNH infectés par le SIV, le traitement par l'IL-7 recombinante a entraîné l'activation de la prolifération des cellules T et leur circulation à la périphérie [237, 241] mais en l'absence de l'augmentation de la virémie. La capacité de l'IL-7 à améliorer les réponses aux antigènes de faible affinité étaye son potentiel d'adjuvant [245].

Plus récemment, les effets d'un traitement à l'IL-7 au stade aiguë de l'infection par le SIV chez les macaques rhésus ont démontré une expansion et un maintien important du nombre de cellules T CD8 pendant et 3 semaines après le traitement. Cette expansion est associée aux cellules T CD8 naïves et à des niveaux accrus de protéines anti-apoptotiques. Enfin, aucune augmentation significative de la virémie n'a été observée. [237].

Si l'IL-7 doit être utilisée comme traitement contre le HIV-1, la fenêtre de temps d'administration de la cytokine reste à définir. Certaines données précliniques suggèrent que l'IL-7 serait plus efficace pendant la phase aiguë de l'infection. A l'inverse, son administration pendant la phase de contraction précoce (8 à 15 jours après l'infection) était moins efficace que le traitement pendant la phase de contraction tardive (16 à 25 jours après l'infection). Par ailleurs, une période prolongée de traitement par l'IL-7 (8-30 jours après l'infection) favorise les réponses antivirales des LT CD8, dotés d'une fonctionnalité améliorée et ont exprimant des niveaux accrus de Bcl-2 et IL-7R α . La thérapie par l'IL-7 pendant la phase tardive de contraction conduit à un boost des LT CD8 mémoires après une infection virale ou une vaccination à ADN, en raison d'une prolifération cellulaire [246, 247]. De plus, les LT CD8 mémoires nouvellement générées ont montré de meilleures réponses de rappel et un contrôle viral amélioré [246, 247].

Cependant, les résultats des traitements par l'IL-7 semblent être moins efficaces que ceux obtenus avec l'IL-15 pour améliorer la fonction effectrice des cellules T CD8+ spécifiques au HIV-1 *in vitro* [240, 248]. Toutefois, contrairement à l'IL-7, la production d'IL-15 est déficiente dans l'infection par HIV-1 [240].

Dans une étude, Bhadra et ses collaborateurs ont démontré que dans le contexte d'une toxoplasmose aiguë, l'absence à la fois d'IL-7 et d'IL-15 entraîne la diminution du développement des LT CD8, affectant leur survie et leur différenciation en cellules mémoires mais ne diminue pas le nombre de CD8+ initial [249].

Chez les macaques rhésus chroniquement infectés par SIV_{mac251} et traités par ART, il a été démontré que l'IL-15 augmente la prolifération des cellules T CD4 et CD8 effectrices. D'autre part, l'administration d'IL-7 à des macaques sains ou infectés par le SIV entraîne l'augmentation de la prolifération de toutes les sous-populations de cellules T et améliore la production thymique *de novo* [240]. De même chez l'homme, des taux sériques élevés d'IL-15 ont été corrélés à un meilleur contrôle de l'infection par HIV-1. Il a été démontré que l'association de HAART avec le traitement IL-15 pourrait augmenter la prolifération des cellules T CD4 et CD8 mémoire effectrices [237]. Chez les macaques immunisés non infectés, l'IL-15 augmente les réponses anamnétiques.

Bien que ces éléments soient en faveur de l'action des cytokines contre l'infection, les résultats d'autres travaux ne sont pas favorables. En effet, il a été montré que l'IL-15 serait corrélée avec une réplication virale accrue dans l'infection par HIV-1 et SIV_{mac}. Le traitement de l'infection SIV_{mac} aiguë avec l'IL-15 a entraîné une augmentation de 1000 fois la charge virale. Il diminue également les réponses des anticorps anti-SIV_{mac} mais améliore la prolifération homéostatique des cellules T CD4+ mémoire, entraînant l'augmentation de la virémie [237, 250]. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'IL-7 et l'IL-15 sont connus pour favoriser la génération et le maintien de cellules T mémoires grâce à l'augmentation de l'expression de Bcl-2 anti-apoptotique. Ainsi, ils peuvent également contrecarrer les signaux pro-apoptotiques induits par les cellules T CD4 infectées et favoriser l'établissement et le maintien de cellules à longue durée de vie infectées de manière latente, suggérant ainsi que l'IL-7 et l'IL-15 peuvent contribuer à la persistance des cellules infectées par le HIV-1 [251].

D'un autre côté, l'IL-15 a récemment fait l'objet d'essais cliniques pour l'immunothérapie anticancéreuse. Chez les patients atteints de leucémie, il a été montré que l'IL-15 favorise la prolifération, la survie et le développement des lymphocytes. Elle diminue aussi les

proportions de protéines pro-apoptotiques telles que Bim et Puma par l'activation de la voie PI3K/AKT [242, 252]. Dans une étude récente, l'IL-7 et l'IL-15 ont été utilisées en association avec un vaccin contre la maladie de Newcastle (NDV). Les résultats montrent une efficacité significativement supérieure à augmenter les cellules T CD4 et CD8 spécifiques de NDV comparé au vaccin seul [253].

DermaVir, un prototype vaccin ADN thérapeutique contre HIV-1, est un bon exemple de la capacité adjuvante de l'IL-7 et de l'IL-15. Les tests de tolérance ne démontrent aucune toxicité des cytokines ajoutées. Le début des essais cliniques n'a montré aucune diminution des lymphocytes T CD4 ni augmentation de la charge virale. De plus, l'effet adjuvant des cytokines conduit à l'amélioration significative des réponses T_{CM} spécifiques des antigènes du HIV-1 [248].

Il a déjà été montré que l'adjuvant vaccinal IL-7 augmentait significativement les réponses effectrices dirigées contre tous les antigènes (dominants mais aussi mineurs), et conduisait à une survie à long terme du pool de cellules mémoires CD8+ nouvellement généré [241]. L'IL-7 peut ainsi augmenter la taille et l'amplitude des réponses des lymphocytes T induites par le vaccin. La co-injection d'IL-15 avec un vaccin ADN HIV induit de manière robuste et durable des lymphocytes T CD8+ effecteurs [241].

Malgré les résultats d'études contradictoires, l'ensemble des résultats démontrent que les cytokines IL-7 et IL-15 constituent de bons candidats pour l'adjuvantation d'un vaccin prophylactique contre HIV-1. Elles favoriseraient le développement, la prolifération et la survie des cellules mémoires CD4 et CD8, et en thérapeutique, elles contrebalanceraient l'effet délétère du HIV-1 sur le système immunitaire. De plus, ces cytokines ont la capacité de faciliter la production de cellules T mémoires non activées qui ne peuvent pas être ciblées par l'infection par HIV-1.

La co-expression de ces cytokines et des antigènes viraux contenus dans un vecteur à ADN devrait mettre en place une réponse mémoire de longue durée pour protéger les individus contre l'infection par le HIV-1.

OBJECTIF DU TRAVAIL

Malgré les nombreux efforts et la diversification des stratégies vaccinales contre l'infection par HIV-1, il n'y a à ce jour aucune stratégie qui parvienne à conférer une protection efficace et durable face à l'infection. Pour cette raison, la nécessité d'une stratégie vaccinale innovante est cruciale pour lutter contre cette infection chronique.

Dans ce contexte, notre laboratoire est parti de l'observation de l'efficacité démontrée des vaccins vivants atténués, qui confèrent des réponses immunitaires soutenues mais décrits comme peu sécuritaires comme l'ont prouvées des études chez les PNH [254]. A l'inverse, la stratégie utilisant des vaccins ADN s'est montrée peu immunogène chez le PNH et l'homme, mais très sécuritaire et induisant des réponses cellulaires Th1 et humorales. Depuis ces dernières années, les vaccins basés sur une réponse cellulaire T connaissent un réel engouement et sont de plus en plus envisagés face à la recrudescence d'indices démontrant que les CD8 cytotoxiques pourraient corrélérer avec la protection face à HIV-1 [255].

Notre laboratoire a combiné dans une même stratégie vaccinale celle de l'ADN et des virus vivants atténués en éliminant les inconvénients évoqués précédemment. Cette stratégie est basée sur l'utilisation du squelette du virus chimère hautement pathogénique SHIV_{KU2}.

Cette combinaison de gènes SIV/HIV permet d'étudier les propriétés immunologiques et sa sécurité chez un modèle animal proche de l'homme : le macaque. L'expression du génome presque complet permet de produire un large spectre antigénique pour induire une réponse immunitaire dirigée vers de nombreux épitopes et ainsi, maximiser la reconnaissance.

Les LTRs du lentivirus caprin naturellement atténué, CAEV (virus de l'arthrite encéphalite caprine) ont été choisis pour remplacer ceux du SIV grâce à ses propriétés constitutive, permettant l'expression élevée des antigènes viraux en continu, augmentant l'immunogénicité du vecteur. L'expression constitutive de ce LTR est à la base de l'atténuation naturelle du virus et le contrôle efficace de ce dernier chez la plupart des animaux naturellement ou expérimentalement infectés. Cela aboutit même à une élimination totale du virus notamment chez les bovins qui ne présentent plus aucune trace de latence ou persistance virale et une éradication totale du virus 4-6 mois après l'infection [8].

Afin de rendre ce vaccin sécuritaire, le gène de l'intégrase a été supprimé pour empêcher toute insertion du lentivecteur dans l'ADN hôte. Egalement, la présence des LTRs du CAEV, n'interagissent pas avec l'intégrase du HIV-1.

Enfin, l'expression des gènes du lentiADN par les cellules hôtes permet la production et relargage de particules virales non infectieuses, dont la conformation permet de mimer l'infection. Ces particules pourront effectuer un cycle unique de réplication dans les cellules permissives mais n'intégreront pas le génome vaccinal dans celui de l'hôte. Ce mécanisme innovant va permettre d'accroître l'immunogénicité.

Après administration d'une dose unique mais élevée chez le macaque, le vaccin «CAL-SHIV-IN⁺», s'est montré efficace pour conférer une réponse cellulaire de longue durée, à la fois pour les cellules T CD4 et CD8 contre les antigènes Gag et Nef [255]. Egalement, il a été mis en évidence des réponses B produisant une diversité d'Ac pour optimiser le contrôle rapide de la réplication de virus SIV_{mac251}. Ainsi, 100% des macaques immunisés ont été protégés après l'infection à faible dose par le virus d'épreuve par la voie intra rectale [255].

Chez les macaques, une analyse détaillée des réponses immunitaires induites a révélé une immunité de longue durée, spécifique du vaccin. Après phénotypage en cytométrie en flux, le profil de ces cellules s'est révélé être des lymphocytes T CD8 centrale mémoire (Tcm) et effectrice mémoire (Tem), mais également des cellules précurseurs mémoires dotées d'une forte capacité proliférative (PHPC) et des Tscm, « stem cell memory ». Ces capacités de survie et de forte prolifération avec auto-renouvellement sont essentielles pour contrôler l'infection par HIV-1 [133, 136].

Afin d'accroître ce pool de cellules mémoires spécifiques, nous avons choisi d'adjuver notre vaccin avec les cytokines IL-7 et IL-15, impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes comme décrit précédemment.

L'hypothèse est que la co-expression de ces deux cytokines avec les antigènes viraux contenus dans le vaccin permettrait d'accroître ce pool de cellules T mémoires de longue durée, conduisant à la protection contre l'infection par HIV-1. L'étude des propriétés de ces vaccins adjuvés a été réalisée chez le modèle souris, puis chez le macaque rhésus

Dans un premier temps, le gène *eGFP* fusionné à une séquence IRES (pour « Internal ribosome entry site ») a été introduit dans le génome du vaccin CAL-SHIV-IN⁺. La fluorescence a été détectée dans les cellules exprimant le vaccin, ce qui signifie que le site d'insertion permet l'expression génique. Cette stratégie a alors été retenue pour le développement de lentivecteur CAL-SHIV-IN⁺ co-exprimant des cytokines comme adjuvants. Les séquences codantes pour les cytokines rmIL-7 et rmIL-15 de macaque ont été fusionnées à la séquence IRES, respectivement, puis insérées dans le vecteur CAL-SHIV-IN⁺ pour

obtenir les lentiADN CAL-SHIV-IN⁻ IRES-IL-7 et CAL-SHIV-IN⁻ IRES-IL-15 (**Figure 22**). La coexpression des cytokines avec les antigènes vaccinaux permettrait d'augmenter le pool de cellules mémoires induites par le vaccin.

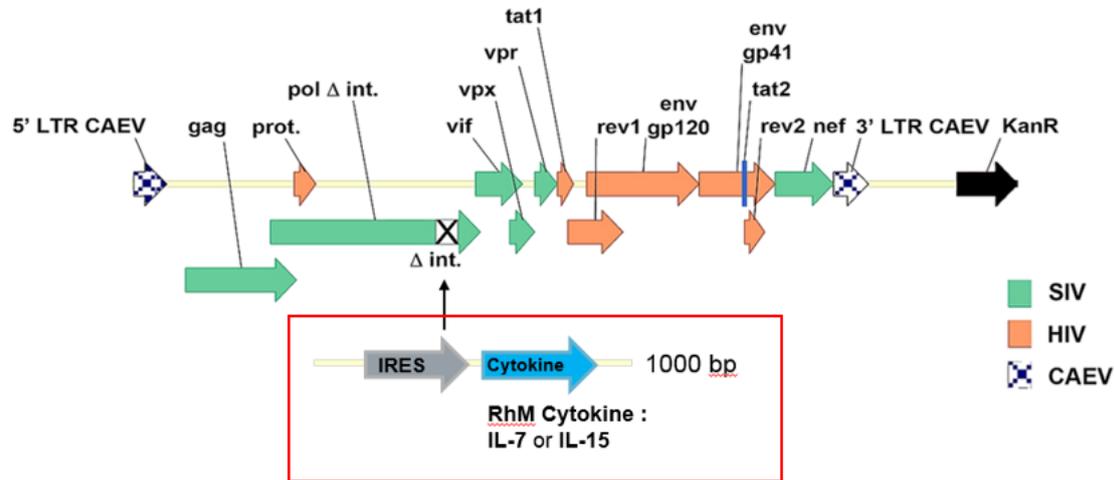


Figure 22 : Insertion des cytokines IL-7 et IL-15 dans le vecteur CAL-SHIV-IN⁻

A ce jour, il n'existe pas de tests permettant d'évaluer le maintien de l'immunité cellulaire spécifique induite par les vaccins. Une méthodologie permettant de mettre en évidence la capacité de rappel et de prolifération des cellules mémoires spécifique du vaccin facilitera l'évaluation de cette réponse.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une proportion élevée de PHPC dans les PBMC de sujets vaccinés peut être utilisée comme marqueur prédictif d'une immunité protectrice durable. Dans ce projet, nous avons mesuré les lymphocytes T effecteurs mémoire circulants et les PHPC spécifiques de l'Ag chez neuf donneurs humains. Nous avons sélectionné 5 vaccins licenciés inclus dans le schéma vaccinal français contre des infections aiguës (grippe saisonnière, varicelle, poliomyélite) ou chroniques (hépatite B, tuberculose).

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'immunogénicité des lentivecteur ADN CAL-SHIV-IN⁻IRES-*cytokine* et leur capacité à induire des réponses cellulaires et humorales persistantes chez les modèles animaux souris et macaques. Ce premier axe de recherche sera présenté sous forme d'article en cours de publication. Enfin, le deuxième axe de recherche se focalisera sur la mise en évidence des réponses mémoires à long terme spécifiques des 5 vaccins sélectionnés. Ce second axe de recherche sera présenté sous forme d'un second article en cours de finalisation.

Résultats

Article 1

Cytokine adjuvants IL-7 and IL-15 improve humoral responses of a SHIV lentiviral vaccine in animal models

Laury-Anne Leroy, Alice Mac Donald, Aditi Kandlur, Deepanwita Bose, Peng Xiao, Jean Gagnon, François Villinger, Yahia Chebloune

Objectif : L'objectif de cet article a été de caractériser les propriétés du lentivecteur ADN CAL-SHIV-INIRES-*cytokine in cellulo*, puis *in vivo* chez le modèle murin puis macaque. Les études *in cellulo* ont tout d'abord permis la caractérisation de l'expression des antigènes viraux et l'expression et la sécrétion des cytokines IL-7 et IL-15. L'immunisation chez la souris a permis d'évaluer l'immunogénicité des prototypes vaccins. L'immunisation chez les macaques rhésus ont permis de confirmer et caractériser les réponses cellulaires, et de suivre leur évolution sur le long terme. Également, la réponse humorale a été évaluée.

Résultats : Afin d'évaluer la production de protéines virales et des cytokines IL-7 et IL-15, des cellules HEK 293T ont été transfectées avec les ADN du CAL-SHIV-IN et des CAL-SHIV-IN IRES-cytokines. L'analyse ELISA de quantification des protéines a montré leur présence dans une fenêtre de temps relativement proche, aux alentours de 2-3 jours post-transfection. Également, la présence d'effets cytopathiques sur des cellules lymphocytaires indicatrices mises en co-cultures ou en présence des surnageants de transfections ont indiqué la fonctionnalité des protéines Env virales. Enfin, la démonstration que les cytokines contenues dans les surnageants de transfection soient capables de maintenir des PBMCs humains pendant culture de 12 jours, au même titre que des cytokines recombinantes est la preuve que les cytokines sécrétées sont elles aussi fonctionnelles.

Les analyses de l'immunogénicité des vecteurs CAL-SHIV-IN- IRES-cytokines ont été réalisées en parallèle avec celles du vecteur parental non-adjuvé CAL-SHIV-IN successivement chez les souris BALB/cJ. Les splénocytes ont été isolés aux semaines 2, 4, 8 et 10 après l'immunisation et utilisés pour évaluer les proportions de cellules T spécifiques des antigènes du vaccin, productrices de cytokines et prolifératrices en réponse à des stimulations antigéniques. Ces examens ont été réalisés par ELISpot IFN- γ et cytométrie en flux multiparamétrique. Les résultats de ces analyses ont montré que les vecteurs exprimant les cytokines ont une immunogénicité plus durable chez les souris BALB/cJ comparés à ceux obtenus avec le vecteur parental.

L'immunisation des macaques rhésus a pu mettre en évidence la présence d'anticorps IgG circulants et IgA muqueux spécifiques des antigènes vaccinaux, présents jusqu'à 40 semaines post-immunisation avec les lentivecteurs ADN contenant les cytokines. Également, ces anticorps étaient capables d'induire une activité ADCC. Ces éléments permettent d'affirmer notre hypothèse, et que les cytokines permettent d'améliorer la réponse immunitaire conférée par notre prototype lentivecteur ADN avec un allongement de ces réponses spécifiques.

Article

Cytokine Adjuvants IL-7 and IL-15 Improve Humoral Responses of a SHIV LentiDNA Vaccine in Animal Models

Laury-Anne Leroy¹, Alice Mac Donald¹, Aditi Kandlur¹, Deepanwita Bose², Peng Xiao², Jean Gagnon¹, François Villinger² and Yahia Chebloune^{1,*}

¹ PAVAL Lab., Institut national de Recherche d'Agriculture et Environnement, Université Grenoble Alpes, 38400 Saint Martin d'Hères, France; laury-anne.leroy@univ-grenoble-alpes.fr (L.-A.L.); alice.mac.donald@umontreal.ca (A.M.D.); admeem@gmail.com (A.K.); jgagnon@fastmail.com (J.G.)

² New Iberia Research Center, University of Louisiana at Lafayette, New Iberia, LA 70560, USA;

deepanwita.bose@louisiana.edu (D.B.); peng.xiao@louisiana.edu (P.X.); francois.villinger@louisiana.edu (F.V.)

* Correspondence: yahia.chebloune@inrae.fr or yahia.chebloune@univ-grenoble-alpes.fr; Tel.: +33-456520866

Citation: Leroy, L.-A.; Mac Donald, A.; Kandlur, A.; Bose, D.; Xiao, P.; Gagnon, J.; Villinger, F.; Chebloune, Y. Cytokine Adjuvants IL-7 and IL-15 Improve Humoral Responses of a SHIV LentiDNA Vaccine in Animal Models. *Vaccines* **2022**, *10*, 461. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030461>

Academic Editors: Toshio Hattori and Mudit Tyagi

Received: 8 February 2022

Accepted: 15 March 2022

Published: 17 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: HIV-1 remains a major public health issue worldwide in spite of efficacious antiviral therapies, but with no cure or preventive vaccine. The latter has been very challenging, as virus infection is associated with numerous escape mechanisms from host specific immunity and the correlates of protection remain incompletely understood. We have developed an innovative vaccine strategy, inspired by the efficacy of live-attenuated virus, but with the safety of a DNA vaccine, to confer both cellular and humoral responses. The CAL-SHIV-IN⁻ lentiDNA vaccine comprises the backbone of the pathogenic SHIV_{KU2} genome, able to mimic the early phase of viral infection, but with a deleted integrase gene to ensure safety precluding integration within the host genome. This vaccine prototype, constitutively expressing viral antigen under the CAEV LTR promoter, elicited a variety of vaccine-specific, persistent CD4 and CD8 T cells against SIV-Gag and Nef up to 80 weeks post-immunization in cynomolgus macaques. Furthermore, these specific responses led to antiviral control of the pathogenic SIV_{mac251}. To further improve the efficacy of this vaccine, we incorporated the IL-7 or IL-15 genes into the CAL-SHIV-IN⁻ plasmid DNA in efforts to increase the pool of vaccine-specific memory T cells. In this study, we examined the immunogenicity of the two co-injected lentiDNA vaccines CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15 in BALB/cJ mice and rhesus macaques and compared the immune responses with those generated by the parental vaccine CAL-SHIV-IN⁻. This co-immunization elicited potent vaccine-specific CD4 and CD8 T cells both in mice and rhesus macaques. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) antibodies were detected up to 40 weeks post-immunization in both plasma and mucosal compartments of rhesus macaques and were enhanced by the cytokines.

Keywords: HIV-1; DNA vaccine; CAEV LTR; LentiDNA; SHIV; IL-7; IL-15; *Rhesus macaques*

1. Introduction

Since its discovery in the early 1980s, the zoonotic human immunodeficiency virus (HIV)-1 has been responsible for a long-lasting pandemic. The virus is mainly transmitted from human to human via sexual intercourse, or by contact with infected body fluids, e.g., via shared contaminated needles among intravenous drug users. Although the life cycle and the pathogenicity of this virus are now well-understood, lasting challenges remain to elucidate the correlates of protection that need to be elicited by a protective vaccine and how to eradicate the virus from infected patients on antiretroviral therapy (ART). HIV-1 infection rapidly seeds persistent reservoirs in various lymphoid organs as well as in sanctuary sites such as brain, testis, and gut-associated lymphoid tissues (GALT) [1] and in long-lived non-activated memory T cells, which outlive even long-term effective ART [2]. Many vaccine prototypes and strategies have already been tested against HIV, with only a few reaching phase III clinical trials, but not beyond [3]. From viral vectors expressing HIV-1 genes (HVTN 502, Merck trial) to recombinant envelope subunits to generate neutralizing antibodies (AIDSVAX trial), the combination of the two in the RV144 trial or the latest Uhambo or HVTN 702 trial that was stopped in 2020 due to absence of protection, none of these vaccines demonstrated robust lasting efficacy against HIV infection [4,5]. Among primate lentiviruses, live-attenuated simian immunodeficiency virus (SIV) is almost the only one able to elicit potent and durable immunogenicity and protection from rechallenges in non-human primates (NHP) [6]. However, this approach has also been demonstrated to retain significant pathogenicity and the ability to compensate for their genetic attenuation in vivo [7–9]. While this approach has been abandoned clinically, it has provided a model from which protective correlates could be identified [10,11]. Attempts to harness the power of virus inoculation using a variety of recombinant viral vectors (Ad5 [12], MVA [13], CMV [14]) have produced immune responses, but to date, limited data on protection. In addition, the use of such vectors is generally limited by vector-specific immune responses induced by natural virus infection or primed by the vaccine, precluding booster immunizations with the same vector. This was illustrated in the phase IIb trial “STEP” led by Merck. The vaccine was based on recombinant Ad5 viral vector expressing subtype B HIV-1 genes coding for Gag, Pol or Nef [15]. This trial was prematurely stopped after the vaccinated cohort showed higher levels of infection. This was possibly caused by reactivation of Ad5-specific CD4 T cells that became the major HIV target. Indeed, around 90% of the tested population showed high Ad5 antibody levels [15]. In contrast, plasmid DNA immunization does not lead to responses against the vector, allowing for repeated injections of genetic material, but this approach has shown limited immunogenicity in NHPs and humans [16,17]. However, when strategies to

improve immunogenicity (prime boost, electroporation, optimized gene expression, etc.) were applied, DNA vaccine injections led to Th1 cellular as well as humoral responses. Both types of immune responses are thought to be necessary to fully control this chronic disease. Vaccines eliciting T-cell responses are becoming an important objective, as many studies on macaques and humans showed that cytotoxic CD8 T cells correlate with protection against HIV-1 [18,19]. DNA vaccines have been markedly enhanced by incorporation of electroporation (EP) as a method to enhance DNA uptake by up to 10- to 100-fold [20] into cells while also causing low-level inflammation. Administered intramuscularly, EP promotes the release of cytokines such as MIP-1 β and recruitment of immune cells such as dendritic cells (DC), neutrophils, monocytes, B cells, and CD4 and CD8 T cells into tissues [21]. These cytokines and infiltrating cells do not damage tissues but rather contribute to immune priming [22]. Skin EP and particularly the intradermal route is also often utilized, as this compartment is rich in professional antigen-presenting cells (APCs) such as Langerhans cells that are able to cross-present vaccine antigens to naïve cells in draining lymph nodes. DNA immunization with EP generates both CD4 and CD8 T-cell responses.

In keeping with the unique ability of live attenuated vaccine to induce protection, we have developed an innovative lentiDNA vaccine, termed CAL-SHIV-IN⁻, that is able to perform a single cycle of replication in host cells. This strategy allowed for the release of viral immunogens and a reinforced presentation of the different antigens, leading to a robust immune response in a setting of prime boost strategy [23]. A single injection of this lentiviral vaccine prototype in cynomolgus macaques induced persistent SHIV-specific CD4 and CD8 T cells for up to 80 weeks post-immunization, with central memory (T_{cm}) and effector memory (T_{em}) cells secreting cytokines against Gag and Nef. More importantly, these responses allowed the animals to control viremia after repeated intrarectal challenges with SIV_{mac251} [24]. This vaccine was, however, not expected to prevent mucosal virus acquisition due to the mismatched envelopes, leaving ample room for improvement.

IL-7 and IL-15 are pleiotropic cytokines, known to increase proliferation, function, differentiation and survival of T cells [25–27]. Mice administered with a plasmid DNA vaccine formulation containing HIV-1 Gag with IL-7 or IL-15 (DermaVir) significantly enhanced Gag-specific central memory and effector memory CD8⁺ T cells [28,29]. Furthermore, IL-7 administered in the genital tract of female macaques vaccinated with Diphtheria/Tetanus (DT) led to the recruitment of mDCs, macrophages, NKs, and B and T cells to the lamina propria and APCs to epithelium. This recruitment was associated with a chemokine over-expression and faster, durable mucosal antibody responses in vaginal mucosa compared to DT immunization alone. [28,29]. Additionally, several clinical trials have incorporated IL-7 and IL-15 as vaccine adjuvants [28–31], cancer treatments [32], and strategies to counter the diminution or exhaustion of T cells in HIV-1 infection [33]. Therefore, we leveraged the adjuvant activity of these cytokines by insertion of cytokine-coding DNA

cassettes under IRES control. The resulting lentiviral plasmids were then tested *in cellulo* for antigen expression and *in vivo* for their ability to induce antiviral responses. Results of these studies form the basis of this manuscript.

2. Materials and Methods

2.1. DNA Vaccine Construction

To generate CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokine plasmids, we subcloned IRES-driving cytokine cassettes from expression plasmids for rhesus monkey cytokine (pNDgms-rmIL-15 and pNDgms-rmIL-7) provided by Dr François Villinger, New Iberia Research Center, LA (New Iberia, LA, USA). PCR products of cytokine sequences were ligated into the pGEM-T easy plasmid (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The GFP gene was removed from the pGEM-T IRES-GFP and replaced by the cytokine genes isolated from pGEM-T cytokines to generate pGEM-T IRES-cytokine plasmids. Insertion of IRES-cytokines in the genome of CAL-SHIV-IN⁻ followed the same Age I insertion site as for the CAL-SHIV-IN⁻ IRES-GFP vector, previously constructed in our laboratory and shown to efficiently express viral proteins and GFP (data not shown). Constructs having the IRES-cytokine inserted in the sense and antisense transcriptional orientations were isolated.

The selected constructs (Figure A1) were introduced into JM109 bacteria (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and cultured in LB medium supplemented with 100 µg/mL of ampicillin or 50 µg/mL of kanamycin for 20 h at 32 °C under agitation at 150 rpm. Briefly, 5 µL of ligation products were added to 50 µL of bacterial suspension, incubated on ice (15 min), followed by heat shock (90 s at 42 °C) and chilled on ice. Bacteria were then supplemented with 500 µL of SOB media (2% Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂) and incubated for 2 h at 37 °C, 200 rpm. Bacteria were plated on the surface of agar plates, supplemented with ampicillin or kanamycin, and then incubated at 32 °C overnight. Isolated single colonies were transferred into LB/ampicillin or LB/kanamycin medium and grown individually for miniprep screenings. The final vector was transformed into Stbl3 E. coli competent bacteria (ThermoFisher, Illkirch, France) and stored in a 50% glycerol stock at 80 °C. DNA extraction was performed using Nucleospin Plasmid Easy Pure kit or NucleoBond Xtra Maxi Endotoxin Free kit (Macherey-Nagel, Hœrdt, France), according to manufacturer's instructions. The quality of extracted DNA was tested using agarose gel electrophoresis and quantification by measuring OD at 230, 260 and 280 nm with a NanoDrop UV apparatus. Deep sequencing (next-generation sequencing) was performed to verify the complete integrity of constructs.

2.2. Cell Culture

Human Lenti-XTM 293T cell line (Takara bio, San Jose, CA, USA) subcloned for high transfectability and high-titer virus production as well as HEK 293T were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (ThermoFisher, Illkirch, France) supplemented with 10% decompartmentalized fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France) and penicillin/streptomycin (Eurobio, Les Ulis, France), final concentration of 0.05 U/mL and 0.05 µg/mL, respectively (complete DMEM), and used for transfection assays. TZM-bl cells in complete DMEM were used for the neutralization assay. M8166 CD4 T lymphocytes permissive to SHIV infection were cultured in complete RPMI and used to detect cytopathic effects. CEM.NKr-CCR5 CD4⁺ target T cells maintained in complete RPMI medium and KHYG-1 NK cells maintained in complete RPMI medium supplemented with IL-2 (5 U/mL) and cyclosporine A (1 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for the ADCC assay. Cell lines were kindly provided by the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

2.3. Expression of Viral Proteins and Cytokines IL-7 and IL-15

2.3.1. Cell Transfection

HEK 293T cells were transfected with 5 µg DNA of recombinant expression plasmids of the cytokines pNDgms-rmIL-7 or pNDgms-rmIL-15 using the classical phosphate calcium method. Human Lenti-X™ 293T were transfected with DNA constructs CAL-SHIV-IN⁻, CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmIL-7 or CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmIL-15 using jetPEI® Polyethylen- iminø reagent (Polyplus, Illkirch, France) at a DNA:jetPEI ratio of 1:3. Briefly, 1 × 10⁶ cells in suspension were seeded in a 6-well plate (VWR, Rosny-sous-Bois, France). Three µg of sterile, endotoxin-free DNA (>90% supercoiled) were complexed with jetPEI and added to the cell monolayer. Supernatants were collected at 2, 3 and 5 days post-transfection, cleared by centrifugation and frozen at -80 °C prior to ELISA.

2.3.2. E Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA

To assess viral protein expression, supernatants from transfected cells were quantified by the SIV Gag p27 kit (ABL, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's recommendations. A linear regression curve-fit was created to determine the Gag p27 concentration. Supernatants from transfected cells were also tested for cytokine expression using the ELISA Human IL-7 or IL-15 DuoSet (R&D systems, Lille, France) kits according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm with a POLARstar Omega Plate Reader Spectrophotometer (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France), and blank was subtracted. Quantitative analysis of samples was performed using a four parameter logistic (4PL) curve-fit via MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

2.3.3. Functional Analysis of Cytokines

To evaluate cytokine functions, we used cryopreserved human PBMCs from a BCG- vaccinated blood donor in a PHPC assay setting [23]. Briefly, PBMCs were thawed and incubated 24 h prior to use in the assay. Cells (2.5 × 10⁵) were seeded in an IFN-γ ELISpot assay (Mabtech, Sophia Antipolis, France) precoated plate and stimulated with 4 µg/mL of heat-inactivated and sonicated Polish BCG vaccine (Sanofi Pasteur MSD-50 µg/0.1 mL or 1.5-6 × 10⁵ viable units of Moreau, Brazil strain). Another fraction of PBMC (10⁶ cells/well) was cultured for 12 days to evaluate the precursor with high proliferation capacity (PHPC) memory cells in the presence of 4 µg/mL of the same antigen and stimulated with homeostatic cytokines. On day 3, cultures were supplemented with recombinant simian IL-2 (10 U/mL from the Resource for NHP immune Reagents) only. On day 7, a cocktail containing simian IL-2 (10 U/mL), recombinant simian IL-7 (Cytheris; now Revimmune Inc., Paris, France) and IL-15 or cytokine released in the culture medium of HEK 293T cells transfected with CAL-SHIV-IN⁻ IRES cytokines was added to the cultures. Recombinant and HEK-293T cell-produced IL-7 and IL-15 were all used at 100 pg/mL. On day 11, 2 × 10⁵ cells per well of expanded PBMCs were tested for BCG-specific responses by IFN-γ ELISpot assay.

2.4. Evaluation of Immunogenicity in Animal Models

2.4.1. Ethical Statements

Animal studies were performed according to NIRC standard operating procedures (with the exception of noted exemptions in the study protocol) and according to the "Guide" of Animal Use in Research. All animal study protocols were reviewed and approved by the University of Louisiana at

Lafayette Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) under approval 2019-8743-030.

Mice were housed in compliance with the “Guide”, the AWA and AWR. Five mice were housed per cage to allow social interactions, with enrichment such as cellulose, pieces of wood or cardboard rolls. Housing of mice was under controlled conditions of humidity, temperature, and light (12 h white light/12 h red light). Water and dry pellets were provided ad libitum. Mice were anesthetized with isoflurane vapor (Patterson Veterinary) and monitored until awake.

Macaques were housed in adjoining individual cages allowing social interactions, under controlled conditions of humidity, temperature, and light (12 h light/12 h dark cycles). They were fed 8773 Harlan Teklad NIB Diet Monkey Chow, or its equivalent, in amounts appropriate for the size of each animal. Water was provided ad libitum via automatic watering devices. Macaques were provided with environmental enrichment including toys and novel food items such as fruits or nuts. Food was withheld the morning of scheduled sedations to insure a minimum of 4 h fast prior to sedation. All collections and immunizations were performed under sedation with ketamine HCl, 5–10 mg/kg, and/or Telazol, 4–8 mg/kg.

2.4.2. Mice

Groups of 4–6 week-old male and female BALB/cJ mice (Jackson Laboratory, Bay Harbor, ME, USA) were used and distributed as follows: 2 groups of 20 mice, group 1: injected with a total of 100 μg CAL-SHIV-IN⁻ in 100 μL sterile endotoxin-free PBS (Quality Biological); group 2: co-immunized with a total of 100 μg of a 1:1 mixture of CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-15, in 50 μL each of sterile, endotoxin-free PBS. Two mice in group 3 were used as negative control (non-immunized). Six weeks post-immunization, group 1 and 2 were boosted with the exact same procedure as the first immunization (Figure A2).

Briefly, mice were anesthetized under isoflurane vapors and shaved prior to immunization. A total of 100 μg of DNA was injected, 50 μg intradermally (ID) in the lower back of the mouse, and 50 μg by intramuscular (IM) route in the right-side quadriceps. Intradermal injection was immediately followed by electroporation using a CUY21 edit II electroporator, (BEX CO, LTD., Nagoya, Japan) and 10 mm diameter platinum tweezer electrodes (BTX, Holliston, MA, USA). To improve conductivity between skin and electrodes, a small amount of conductive gel (SignaGel, Parker, Fairfield, NJ, USA) was used. Impedance between the electrodes and the skin was checked before each electroporation. The following parameters were used: a constant square-wave current, with 1 pulse allowing creation of pores in the cell membrane (poration pulse Pp)–700 V/cm for 10 ms, and 5 pulses to drive the DNA into the cells (driving pulse Pd)–100 V/cm for 10 ms, spaced by 50 ms. A limit of 300 mA maximum was delivered (PdA). Interspace between the two electrodes was set to 0.2 cm, and the generator programmed on Pp = 140 V and Pd = 20 V.

Five mice per group and per time point (week 2, 4, 8 and 10 post-immunization) were euthanized to collect blood by intracardiac puncture and the spleen to characterize both humoral responses in serum and cellular responses in splenocytes.

2.4.3. Macaques

Six male rhesus macaques (*Macaca mulatta*) from the New Iberia Research Center (NIRC) colony were used for this study and equally split into

2 groups according to body weight, age and MHC alleles (see Table A1). These animals were previously genotyped using DNA isolated with the QIA amp DNA Blood kit (Qiagen) and PCR with specific primers, for the evaluation of the MHC alleles Mamu A 001, B 008 and B 017, known to be factors favoring the virus control, and to distribute these profiles among groups.

The first group received the CAL-SHIV-IN⁻ vaccine, while the second group received a combination of the two DNA CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-15, mixed in equal amounts. Large-scale DNA vaccine preparations were resuspended aseptically in endotoxin-free PBS at a final concentration of 2 mg/mL. Each monkey received 5 mg of DNA vaccine for the prime injection: 4 mg were given by intramuscular injection (IM) and 1 mg intradermally (ID) in the scapular area. IM injections were administered in the 2 quadriceps (2 mg of DNA in each muscle), followed by electroporation (EP) (Collectra 2000, Inovio Pharmaceuticals) with 3 pulses of 52 ms, 0.5 A, and 1 s between pulses. ID injections were separated in 2 sites with 0.5 mg/site, followed by electroporation (T820 Electro square wave porator BTX, Holliston, MA, USA) and 10 mm diameter platinum tweezer electrodes (BTX, Holliston, MA, USA) together with a small amount of conductive gel (SignaGel, Parker, Fairfield, NJ, USA). Six pulses of 10 ms, 110 V, with 1 s interval between pulses were applied. The same scheme was repeated for the homologous boost 16 weeks after the prime immunization.

Blood collection for PBMCs and plasma isolation: Blood samples were collected by venipuncture in EDTA vacutainer-type tubes from all animals and kept at room temperature until processing. PBMCs were isolated on Ficoll-Hypaque gradient using a standard method and used for the different assays.

Lymph node fine needle aspirate (FNA): Lymph node aspirates were collected from superficial left and/or right draining lymph nodes. The skin above the node was disinfected and the node entered with a 21–23 G needle. Once the needle was in the node, cells were aspirated, the syringe needle removed, and cells expelled into a tube containing complete RPMI medium. The tubes were transported on wet ice for processing.

Rectal Fluids: Two weck-cel sponges extended by a transfer pipet, pre-moistened with 50 µL of physiological saline, were introduced into the rectum inside a cut 5 mL pipet and pushed against the mucosa by pushing on the transfer pipet. The weck-cel sponges were left to absorb mucosal fluid for 5 min before pulling them back into the pipet and removing the pipet from the rectum. Weck-cel sponges were then placed into 5 mL polypropylene tubes on dry ice.

2.4.4. Detection of IFN-γ Producing Cells by ELISpot Assay

The day before the assay, PVDF-membrane plates (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) were coated with 50 µL of 5 µg/mL monoclonal antibody anti-IFN-γ (clone 1-D1K or GZ-4, Mabtech, Mariemont, OH, USA), and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed 4 times with complete RPMI and then incubated with fresh complete RPMI for a minimum of 30 min at 37 °C. Two hundred thousand cells were added to the wells and stimulated with 2 µg/mL of peptide pools spanning SIV-Gag, HIV-Env C-terminal or SIV-Nef (AIDS Reagent Repository, NIH-NIAID catalog numbers 6204, 6451, and 8762, respectively). Medium only or PMA- Ionomycin were used as negative and positive controls, respectively, and incubated for 20 h at 37 °C. Plates were washed 4 times with PBS + 0.05% Tween-20 and captured IFN-γ spot-forming units were revealed using anti-IFN-γ secondary antibody coupled with biotin, then incubated with Avidin-D-HRP. Spots were revealed using TMB (SeraCare, Milford, MA, USA), washed with tap water and counted with a CTL-6 Immunospot reader (Cellular Technology Limited CTL, Shaker Heights, OH, USA) after drying the plates.

2.4.5. Multiparametric Flow Cytometry Assay

Mouse splenocytes, macaque PBMCs and lymph node cells were isolated as previously described [24,34]. To assess the phenotype and cytokine production of vaccine-specific T cells, one million cells were stimulated for 6 h with 2 µg/mL of each peptide pool (SIV-Gag, HIV-Env or SIV-Nef, (AIDS Reagent Repository, NIH-NIAID catalog numbers 6204, 6451, and 8762, respectively)) or with PMA/Ionomycin as positive control. Non-stimulated cells were used to subtract the basal secretion signal. For mice splenocytes, 35 µg/mL of TAPI-2 (Sigma, Burlington, MA, USA) was added after 1 h incubation with peptide pools to avoid the CD62L cleavage. CD28 and CD49d (0.5 µg/mL) were used for co-stimulation with Brefeldin A to prevent cytokine excretion. Cells were washed and stained for 20 min with viability marker (Live/Dead, Invitrogen, Waltham, MA, USA) and 30 min with surface Abs for surface staining. CD16/CD32 was added in mouse splenocyte suspensions for 15 min at 4 °C after the live/dead staining to block the Fc receptor. Cells were then permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm reagent (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 20 min at 4 °C and stained for intracellular compounds for 30 min. Antibodies were purchased from BD and eBioscience (Tables 1 and 2). Analysis was performed on a four-laser BD Aria Fusion instrument, calibrated daily with CS&T beads (BD), compensated with anti-Ig κ (BD CompBeads positive and negative) and ArC Beads (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Results were analyzed with FlowJo software for Windows (Version 10.7.1).

Table 1. Panel of anti-mouse antibodies used for the ICS assay.

Extracellular Markers	Fluorochrome	Clone	Company
CD3	Alexa Fluor 700	17a2	BD Pharmingen
CD4	APC-H7	GK1.5	BD Pharmingen
CD8a	Brilliant Violet 605	53-6.7	BD Horizon
CD127	PE-Cy7	Sb/199	BD Pharmingen
CD62L	PE-CF594	Mel-14	BD Horizon
Intracellular Markers	Fluorochrome	Clone	Company
IFN-γ	Brilliant Violet 711	Xmg1.2	BD Horizon
IL-21	eFluor450	Ffa21	eBioscience
IL-2	APC	Jes6-5H4	eBioscience

Table 2. Panel of anti-monkey antibodies used for the ICS assay.

Extracellular Markers	Fluorochrome	Clone	Company
CD3	Alexa Fluor 700	SP34-2	BD Pharmingen
CD4	FITC	L200	BD Pharmingen
CD8	APC-Cy7	SK1	BD Pharmingen
CD28	ECD	n/a	IO Test
CD95	PerCp-Cy5.5	DX2	BD Pharmingen
CD45	APC	D058-1283	BD Horizon
CD107a	BV650	H4A3	Biolegend

Intracellular Markers

Fluorochrome	Clone	Company	
IFN- γ	PE-Cy7	B27	BD Pharmingen
TNF- α	BV785	Mab11	Biologend
MIP-1 β	V450	D21-1351	BD Horizon
Granzyme B	PE	GB11	BD Pharmingen
Brilliant buffer plus			BD horizon

2.4.6. Detection of Total and HIV-Specific Antibodies

ELISA plates (Nunc MaxiSorp™ flat bottom, waltham forest, MA, USA) were coated with anti-Ig or antigen to test plasma or rectal secretion in order to detect total Ig or specific IgG and IgA. For total Ig, plates were coated with 0.25 μg of polyclonal goat anti-monkey IgG + IgA + IgM (LSBio, Seattle, WA, USA) in 100 μL PBS, for 1 h at room temperature.

For specific Ig, plates were coated with 2.5 μg Concanavalin A (ConA) (Sigma, Burlington, MA, USA) diluted in 100 μL of 10 mM HEPES buffer, then incubated for 1 h with HIV-1_{JR-FL} virus diluted in PBS + 1% triton X100 (Sigma, Burlington, MA, USA). Plates were blocked in 2% non-fat dry milk in PBS (Blotting-grade Blocker, BioRad, Hercules, CA, USA) at 4 °C overnight. Dilution of 1:4 (mice) and serial dilutions from 1/50 to 1/6250 (macaques) in PBS 2% non-fat dry milk were used to determine the OD or titers of Ig in the serum samples for each time point. Secondary antibody (Goat Anti-Monkey or Goat Anti-Mouse IgG gamma Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugated, (Rockland, Limerick, PA, USA) or goat Anti-Monkey IgA Biotin Conjugated, (Rockland, Limerick, PA, USA) plus Avidin-D HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) were used. TMB (SeraCare, Milford, MA, USA) was added to the plate, and the reaction was stopped with 1M sulfuric acid and immediately read at 450 nm with an ELISA reader (Synergy HT, Bio-Tek, Taunton, MA USA).

2.4.7. Neutralization Assay

The TZM-bl cell line [35] was used for the neutralization assay. Briefly, heat-inactivated macaque plasma samples taken before vaccination (week 0) and after boost (week 18) were prepared at five-fold serial dilutions starting at 1:10. The diluted plasma samples were incubated with HIV-1_{JR-FL} Tier 2 virus (Clade B) for 1 h at 37 °C and then used to inoculate TZM-bl cells. The luciferase activity was measured 48 h post infection. The definition of 50% inhibitory dose (ID50) reported as plasma reciprocal dilution was the sample dilution at which relative luminescence units (RLU) were reduced by 50% compared with RLU in virus control wells after subtraction of background RLU in cell control wells.

2.4.8. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Assay

The ADCC assay was based on a previously described method [36]. The target cells used were CEM.NKr-CCR5 CD4⁺ T cells expressing firefly luciferase upon HIV-1 infection. NK cells KHYG-1 expressing CD16 served as effector cells. To measure ADCC, target cells were infected with 50 ng of HIV-1_{JR-FL} virus by spinoculation and cultured for 4 days. Two-fold serial dilutions of each heat-inactivated plasma sample were added to the infected targets for 20 min at room temperature in round-bottom 96-well plates. KHYG-1 effector cells were added at a 10:1 effector-to-target ratio and

incubated for an additional 8 h. The cells were lysed, and RLU was measured immediately on a BioTek luminometer. ADCC activity was calculated as follows: (mean RLU at given plasma dilution mean background RLU)/(mean maximal RLU mean background RLU) 100. Fifty percent (50%) ADCC titers indicate the plasma titers required for half-maximal cell lysis (similar to 50% inhibitory concentration (IC₅₀) for neutralization).

2.4.9. Statistical Analysis

Statistical analysis was determined using GraphPad Prism 8 software (version 8.4.3). Medians and means were used for the different graphic presentations. Non-parametric Mann–Whitney, parametric one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison tests were used to determine the significance.

3. Results

3.1. CAL-SHIV-IN⁻ IRES-Cytokine Prototypes Produce Functional Viral Proteins

CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokine vaccine vectors (Figure A1) were transfected into HEK 293T cells using the phosphate calcium method to test whether the vaccine proteins were expressed. Transfected plasmids expressing the macaque cytokines alone and non-transfected (NT) HEK 293T cells were used as negative controls (Figure 1a). Twenty-four hours post-transfection, supernatants were removed, and cell monolayers were washed twice to remove any residual plasmid. Non-adherent indicator, highly fusogenic M8166 CD4 T cells were then seeded on the monolayers to detect cytopathic effects (CPEs) as giant multinucleated cells following fusion of infected M8166 cells. Control co-cultures of non-transfected HEK 293T or HEK 293T cells transfected with pNDgms-rmIL-15 showed no CPE (Figure 1a,b). In contrast, CPEs were readily visible in co-cultures of HEK 293T cells transfected with CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokine constructs (Figure 1c). This demonstrated that the viral Env glycoproteins were correctly synthesized, matured and released or exposed on the surface of transfected cells.

Supernatants from control and CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokine transfected HEK 293T cells were also harvested 3 days post-transfection and used to inoculate the permissive M8166 cell cultures. Again, CPEs were evidenced by 24 h post-infection only with supernatant of HEK 293T cells transfected with CAL-SHIV IN⁻ IRES-cytokines (Figure 1f, black arrows). While the CPEs shown in co-cultures resulted mainly from cell-to-cell contacts (Figure 1c), here the CPEs resulted from direct infection with cell-free one-cycle viral particles released and harvested in the supernatant of transfected cells.

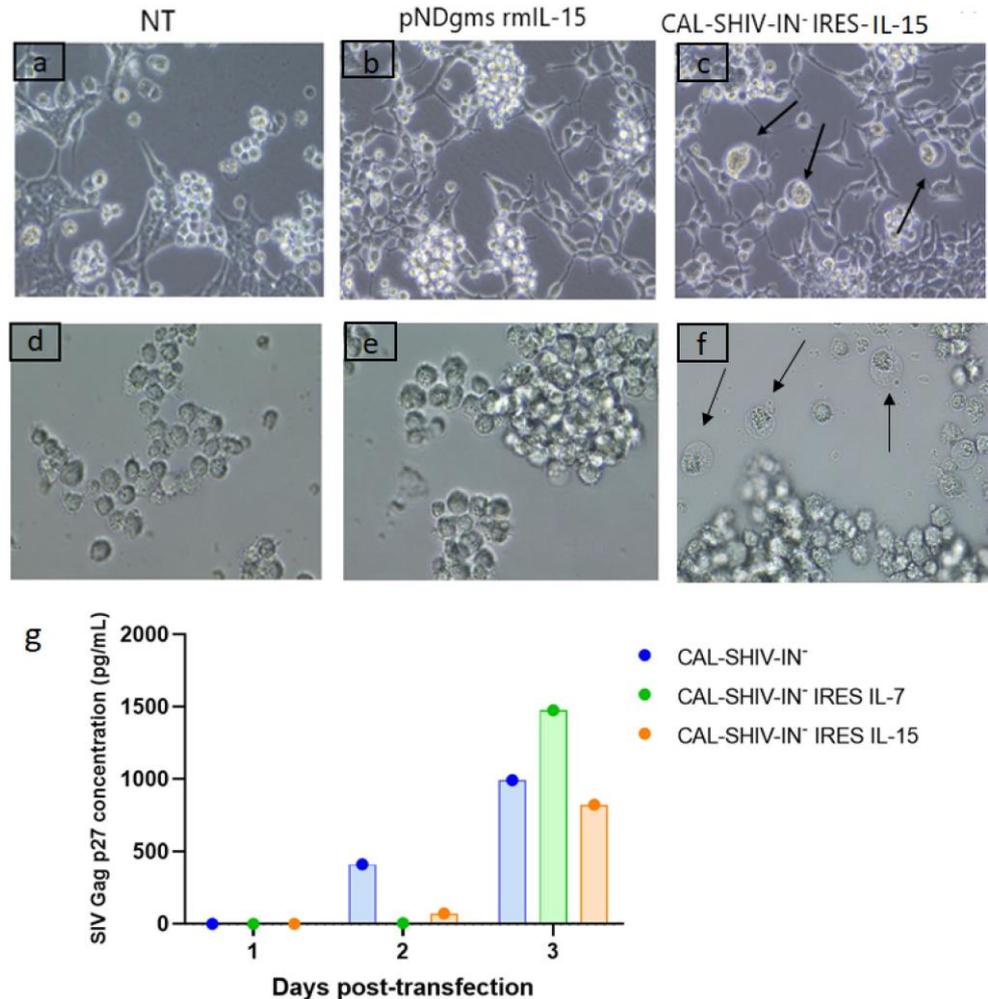


Figure 1. Functional expression of SIV proteins. Co-culture of permissive M8166 lymphocyte cells with HEK 293T cells non-transfected (a), transfected with pNDgms-rmlL-15 (b) or transfected with CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokines (c). CPEs were observed in the cultures with the CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokines (black arrows). Supernatants of HEK 293T cells in (a–c) were used to inoculate cultured M8166 in (d–f), respectively. At 24 h post-inoculation, CPEs were observed only in (f) (black arrows). (g) Quantification of SIV Gag p27 by ELISA: Supernatants of HEK 293T cells in a, b and c harvested at days 1, 2 and 3 post-transfection were analyzed by ELISA. Results were expressed in pg/mL.

SIV Gag p27 proteins expressed and released from transfected HEK 293Ts were also quantified during three successive days. The highest Gag p27 production was seen on day 3 post-transfection for each of the 3 vectors, with 991 pg/mL for CAL-SHIV-IN⁻, 1476 pg/mL for CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 and 823 pg/mL for CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15 (Figure 1g). The Gag p27 expression levels were comparable for the 3 plasmids, suggesting that the insertion of the IRES-cytokine cassette into the genome of CAL-SHIV-IN⁻ did not impact Gag expression.

3.2. IL-7 and IL-15 Cytokines Inserted into CAL-SHIV-IN⁻ Genome Are Expressed, Secreted and Functional

Expression and secretion of both cytokines inserted into the parental vector (Figure A1) were assessed by ELISA in the supernatants of transfected HEK 293T cells. Unlike Gag p27, the maximum cytokine expression and release occurred on day 2 post-transfection and decreased thereafter (Figure 2). The concentration of IL-7 released on day 2 post-transfection was similar in cultures transfected with CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 alone (1664 pg/mL) and those co-transfected with CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15 (1583 pg/mL) (Figure 2A),

indicating that co-transfection had no impact on IL-7 synthesis and release. Similar results were obtained for the production of IL-15 (Figure 2B), suggesting an absence of interference between both transfected constructs. As expected, the control cassettes of IRES-cytokines in antisense did not produce any detectable cytokine.

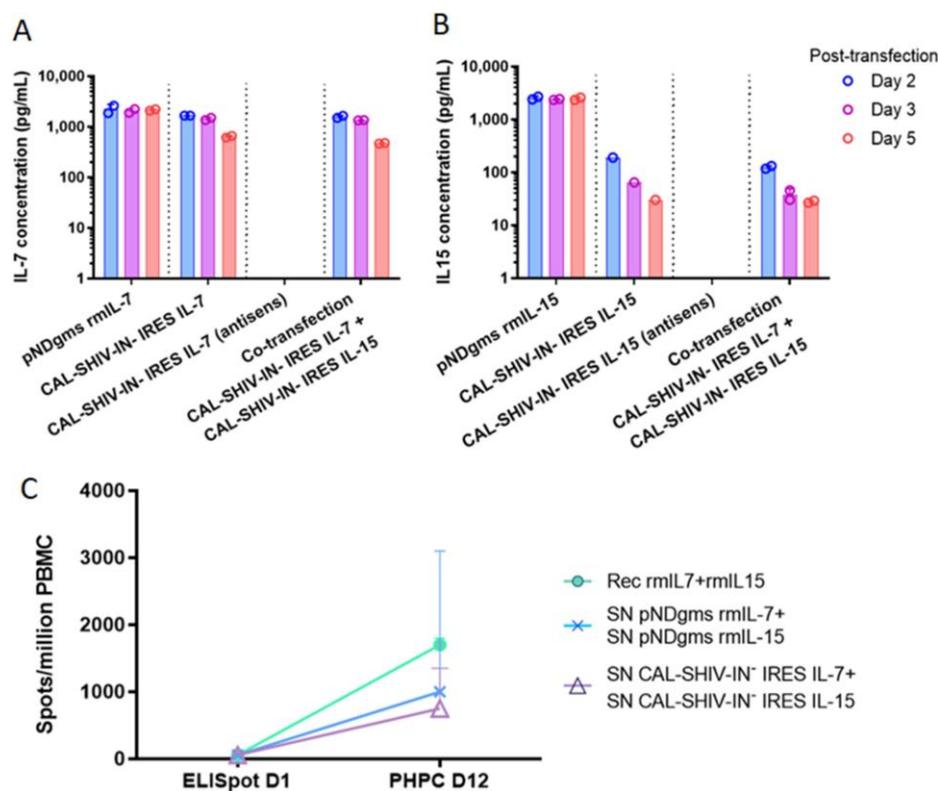


Figure 2. Expression and functional analysis of secreted IL-7 and IL-15 cytokines: HEK 293T cells were transfected with either pNDgms-rmIL-7, pNDgms-rmIL-15 or with CAL-SHIV-IN⁻ IRES- rmIL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-15 alone or co-transfected with both CAL-SHIV-IN⁻ IRES cytokines. Vaccines with antisense cytokine cassette were used as negative controls. Supernatants of transfected cells were harvested at days 2, 3 and 5 and quantified for IL-7 (A) and IL-15 (B). Median values of two independent experiments were used to draw the columns. (C) Human PBMCs from a BCG-vaccinated donor were used in overnight and PHPC assay using the homeostatic cytokines. Quantified spots after 20 h stimulation with BCG vaccine are noted as ELISpot day 1. Spots quantified at 12 days stimulation with indicated cytokines (—○—): recombinant cytokines; (—x—): supernatants of pNDgms transfected HEK 293T cells; (—△—): supernatants of CAL-SHIV-IN⁻ IRES cytokines transfected HEK 293T cells. Median values with 95% CI of the 3 repeated experiments (day 12) are represented.

The cytokine functions were also tested for their ability to drive the homeostatic differentiation of precursors using a functional assay developed previously in our laboratory [23]. PBMCs from a BCG immunized donor were used as target for cytokine stimulation. Immediate effector cells and PHPC-derived effector memory cells were quantified in duplicates of three independent experiments by IFN- γ ELISpot at day 1 and day 12, respectively. The PHPC assay showed an increase in effector memory T cells in all tested conditions (Figure 2C). The recombinant cytokines, used as positive control, induced the highest increase with a median of 1700 spots/million PBMC after 12 days of restimulation with the BCG-vaccine antigen, while only a median of 59 spots/million PBMCs was observed on day 1. Cells cultured with the supernatants of transfected cells demonstrated an increase in numbers, reaching 1000 spots/million PBMCs after 12 days of culture with supernatants from the pNDgms-rmIL-7 and pNDgms-rmIL-15 plasmid transfections, and 750 spots/million PBMCs with supernatants from

the CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15 DNA vaccines.

The differences observed between recombinant cytokines and those contained in supernatants were likely associated with the purity of the commercial cytokines. Nonetheless, the expressed cytokines allowed for differentiation and proliferation of PBMCs, clearly demonstrating the functionality of the cytokines released by both CAL-SHIV-IN⁻ IRES-cytokine vectors.

3.3. Vaccine-Specific T Cell Responses in Vaccinated Mice

T cell immune responses evaluated in splenocytes of immunized mice are summarized in Figure A3. Responses were undetectable following the first immunization (Figure 3). However, Gag- and Nef-specific responses started to be detectable 2 weeks after the boost (week 8 post prime-immunization). Interestingly, 4 weeks after the boost, a marked difference was observed between the two groups of mice. Indeed, mice immunized with CAL-SHIV-IN⁻ showed low CD4 responses to Gag and Nef. CD8 responses were generally undetectable in this group. In contrast, mice immunized with the cytokine-expressing vectors displayed much higher proportions of IFN- γ and IL-2 producing CD4 and CD8 cells specific to both Gag and Nef.

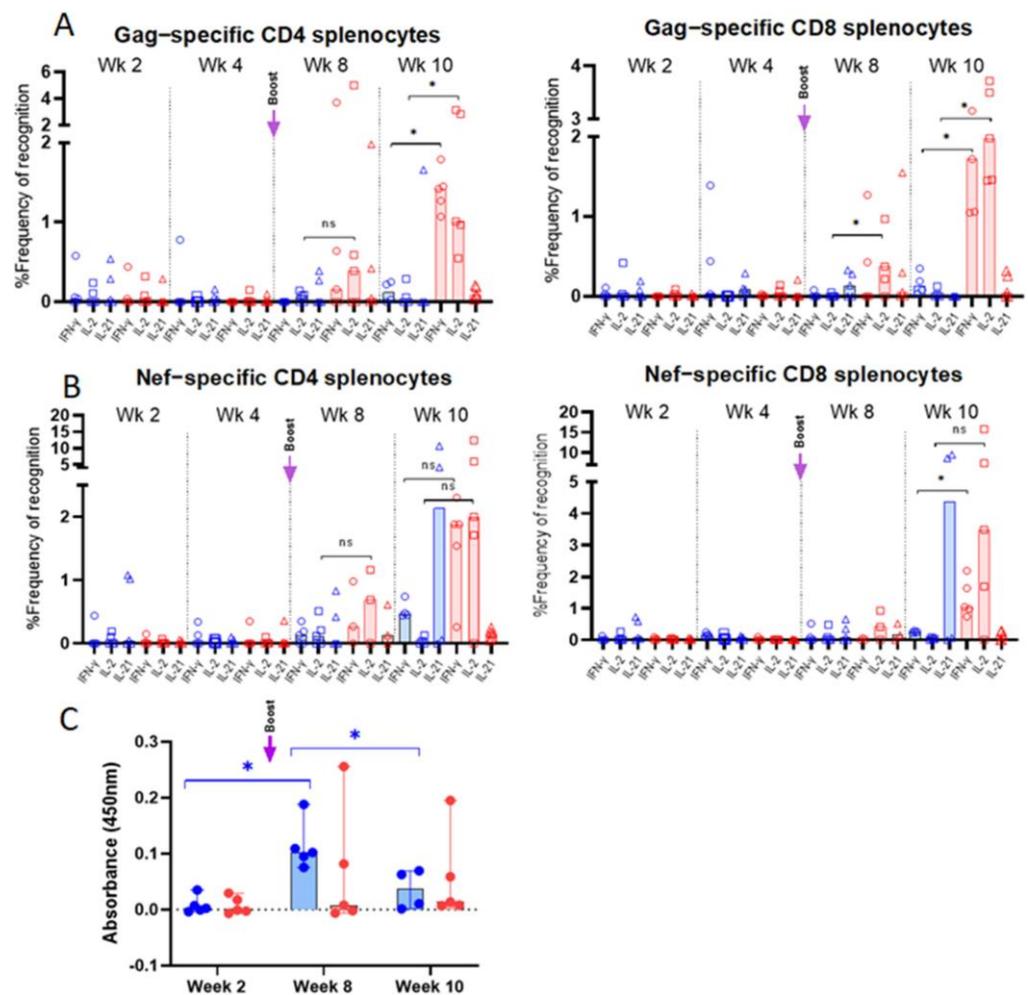


Figure 3. Flow cytometry characterization of vaccine-specific T cells in spleens of BALB/cJ-immunized mice: Splenocytes from group 1 (CAL-SHIV-IN⁻; in blue) and group 2 mice (CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-7 + CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-15; in red), harvested at different time points post-immunization, were stimulated with SIV-Gag and -Nef peptides. Cells were stained with the combination of Abs reported in Table 1, to identify Gag (A) and Nef (B) specific CD4 and CD8 cytokine-secreting T-cells. Results were normalized with unstimulated splenocytes to remove the basal secretion, and median responses were plotted. Non-parametric Mann-Whitney test was calculated. Circles represent the percentage of IFN- γ secreting cells, squares the

percentage of IL-2 secreting cells, and triangles the percentage of IL-21 secreting cells. (C) HIV Env-specific IgG in mouse serum: Serum samples from the two groups were analyzed by ELISA at 2, 8 and 10 weeks post-immunization for the detection of Env-specific IgG.

O.D. (450 nm) are presented after blank and baseline subtraction. Median values with 95% CI are shown. Parametric Tukey's multiple comparison test was calculated. Significant increase ($p = 0.0160$) was observed between weeks 2 and 8, and decrease ($p = 0.0382$) was observed between weeks 8 and 10 for group 1. No statistical significance was observed for group 2. ns: not significant; *: $p < 0.05$.

3.4. Env-Specific Antibody Responses in Vaccinated Mice

HIV Env-specific IgG measured in serum samples is presented in Figure 3C. At two weeks post-immunization, no IgG was detected for both groups 1 and 2. In contrast, a significant ($p = 0.0160$) increase in IgG production was detected in group 1 at week 8 (2 weeks post-boost). A significant ($p = 0.0382$) decrease in IgG titers was observed in group 1 at week 10. The profile of antibody responses did not show significant changes between the 3 time points (weeks 2, 8 and 10).

3.5. Evaluation of Vaccine-Specific T Cell Responses in Immunized Rhesus macaques

The increased immunogenicity in mice guided the immunization protocol for the macaques. Rhesus macaques received two immunizations at a 16-week interval (Figure 4A), with combined intramuscular and intradermal injections, both with EP, as described in the materials and methods section. The vaccine-induced T cell responses were analyzed by IFN- γ ELISpot and multiparametric flow cytometry up to 40 weeks post-immunization.

3.5.1. IFN- γ ELISpot Responses

Macaque PBMCs were tested longitudinally for T cell responses by ELISpot (Figure 4A). Gag (median 77.5 (group 1) and 37.5 (group 2) spots/million PBMCs) and Nef (median 10 (group 1) and 12.5 (group 2) spots/million PBMCs) were detectable as early as 2 weeks post-immunization, but not Env-specific responses. Intriguingly, Gag but not Nef responses appeared boosted in both groups. Interestingly, a peak of Gag-specific IFN- γ secreting cells was observed at week 26 for group 2, reaching 167.5 spots/million PBMCs (near 5-fold increase), suggesting that the IL-7 and IL-15 adjuvanted group 2 may have had a higher recall of effector Ag-specific T cells compared to group 1 (Figure 4A).

3.5.2. Intracellular Cytokine Analysis

To further characterize the Ag-specific T cells post-immunization, we performed phenotype/function analysis of PBMCs at selected time points (Figure 4B) and of mononuclear cells from draining lymph nodes (Figure 4C). Cells were phenotyped and tested for the production of IFN- γ , TNF- α , MIP-1 β , and Granzyme B as well as the degranulation factor CD107a (Figure 4A). Gag-stimulated PBMCs at weeks 26 and 36 post-immunization (10- and 20-weeks post-boost, respectively) were normalized both with unstimulated cells (medium alone) and by subtracting the background responses of each individual macaque before immunization (week 0). Data in Figure 4B show an increase in both CD4 and CD8 T cells producing the inflammatory cytokines after the boost. Surprisingly, the proportions of these cytokine-producing cells were higher for macaques immunized with the parental plasmid (non-adjuvanted with cytokine). Granzyme B secretion was higher at 36 weeks, whereas MIP-1 β was expressed at higher levels around week 26, for both CD4 and CD8 cells.

In the draining lymph nodes, CD4 and CD8 T cells from weeks 18 to 36 showed maintenance of Gag-specific memory T cells, and their capacity of recall. Correlating with PBMC responses, the proportions of cytokine-secreting

cells were higher for group 1 macaques. However, at week 18, the recall of specific CD8 T cells from group 2 macaques led to higher proportions of cells secreting Granzyme B and those expressing CD107a (Figure 4C).

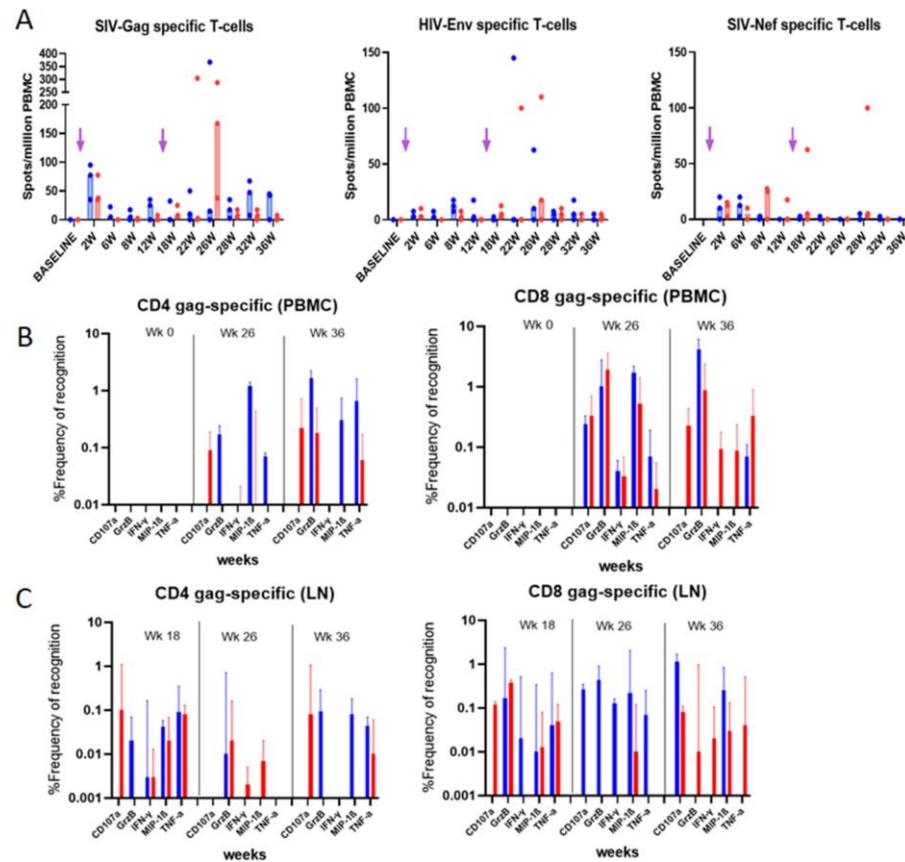


Figure 4. Vaccine-specific T-cell responses in blood and LN mononuclear cells from immunized rhesus macaques: (A) IFN- γ ELISpot responses to Gag, Env and Nef following overnight stimulation. Unstimulated cells were used as negative control for normalization. Median of the 3 animals pergroup is represented. Arrows indicate immunization times. (B) PBMCs and (C) LN mononuclear cells were used for the ICS assay using the panel of Ab reported in Table 2. Frequencies of Gag-specific cells measured at indicated time points are reported. Median values with 95% CI of the proportion of cytokine-secreting cells are shown. CAL-SHIV-IN⁻ group is presented in blue, and CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-7 + CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-15 in red.

3.6. Evaluation of Vaccine-Specific Antibody Responses in Rhesus Macaques

3.6.1. Evaluation of Env-Specific Abs in Macaque Serum Samples

Serum samples of immunized macaques were titrated for Env-specific IgG against HIV-1_{JR-FL} virus antigens by limiting dilution ELISA (Figure 5). Env-specific antibodies were detectable in both groups after the first immunization, and the titers increased after the boost. These titers were maintained in both groups until week 22 (6 weeks post-boost). However, by week 40 (>5 months after the boost), antibody titers diverged between the 2 groups. While high titers were maintained in group 2, they markedly decreased in group 1, suggesting a role for IL-7 and IL-15 in the homeostasis/maintenance of plasma cells, enhancing memory humoral responses. However, these antibodies failed to translate into any neutralizing responses against HIV-1_{JR-FL} tier 2 virus in the serum samples of any macaque (Figure 5B).

Aside from neutralizing activity, ADCC represents another mechanism able

to restrict HIV replication, with ADCC titers correlated with viral control in both macaques and humans [37]. Serum samples of vaccinated macaques were tested for ADCC activity with infectious HIV-1_{JR-FL} virus. Interestingly, Env-specific IgG of both groups showed ADCC activities at weeks 22 and 40 (Figure 5C). However, there was no statistical difference between the values obtained for the two groups. In contrast, a positive correlation was determined between ADCC activity and specific IgG binding titer (Figure 5D). This correlation was stronger for groups 1 and 2 at week 22 ($r = 0.86$ and 0.99 , respectively) than at week 40 ($r = 0.77$ and 0.70).

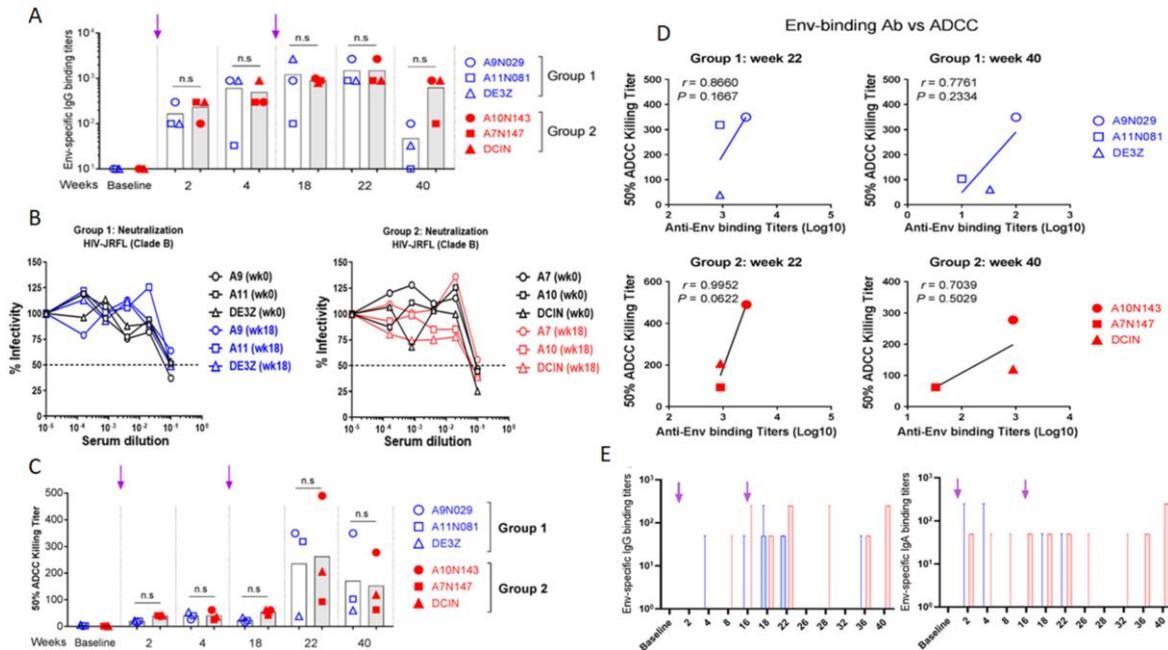


Figure 5. Vaccine-specific Abs in sera and mucosal secretions of vaccinated rhesus macaques.

(A) Serum IgG samples harvested at indicated time points were evaluated by ELISA against inactivated HIV-1_{JR-FL} virus. Mean titers are plotted following subtraction of blank and baseline values. Arrows indicate immunization times. (B) Neutralizing activity of serum Abs was evaluated using the serum neutralization assay against Tier 2 HIV-1_{JR-FL} virus and TZM-bl indicator cells. IC₅₀ was determined by measuring the luminescence after 48 h incubation. (C) Evaluation of ADCC activity. Sera from both groups of vaccinated monkeys were incubated with HIV-1_{JR-FL} to inoculate CEM.NK_r-

CCR5 CD4⁺ target T cells. Effector KHYG-1 NK cells were added at a 10:1 effector-to-target ratio.

After cell lysis, RLU was measured and ADCC activity evaluated for IC₅₀. Mean values are reported.

(D) Comparative evaluation of serum-binding and ADCC specific to Env epitopes in vaccinated macaques. Values were plotted to determine the correlate. (E) Evaluation of Env-specific Abs in rectal secretions. Rectal secretions were collected at indicated time points and analyzed by ELISA to detect both HIV-specific IgG and IgA against inactivated HIV-1_{JR-FL}. Cutoff was determined by subtracting the OD values of blank and baseline and median titers with 95% CI are shown. Group 1 (CAL-SHIV-IN⁻) is represented in blue, and group 2 (CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-7 + CAL-SHIV-IN⁻ IRES-rmIL-15) in red. ns: not significant. Arrows indicate immunization times.

3.6.2. Evaluation of Env-Specific IgG and IgA in Rectal Secretions

Since HIV-1 is mainly transmitted by sexual intercourse (via infected semen, vaginal secretions, or infected cells), mucosal antibodies are thought to be the first line of defense to counteract viral infection. Rectal secretions from vaccinated macaques were collected at different time points and analyzed for the presence of mucosal Env-specific antibodies. Rectal secretions were assayed

by ELISA against HIV-1_{JR-FL} virus to detect Env-specific IgG and IgA (Figure 5E). Mucosal Env-specific IgG responses were only detected post-boost in both groups (weeks 18 and 22). Interestingly these IgG responses, while contracting from week 26 to 32, reappeared at weeks 36 and 40 but only in group 2. In contrast, mucosal IgA responses were only detectable in rectal secretions of group 2 but not group 1 macaques. These IgA responses were first detected after the prime immunization, followed by a rapid decline. However, the second immunization yielded a prolonged anamnestic response 16 weeks later. Moreover, IgA responses were again detectable after a contraction phase of a minimum of 6 weeks (Figure 5E). This suggests that the expression of both cytokines by the vaccine enhanced mucosal immune responses.

4. Discussion

It is well-established now that IL-7 and IL-15 cytokines regulate memory T cell homeostasis. These members of the gamma-chain (γ -c) cytokine family maintain, expand, differentiate and activate T cells to fight chronic infections, (reviewed in [25]). During HIV infection, these cytokines positively regulate both HIV-specific CD4 and CD8 T cells [38,39]. While this positive regulation of CD8 is beneficial for the control of HIV-1 replication, activation of memory CD4 T cells has the potential to increase the number of activated HIV-1 targets [38,40]. In our previous study, we reported that macaques immunized with an HIV lentiDNA vaccine had mounted vaccine-specific T cells that lasted for at least 80 weeks after a single immunization. Detailed characterization of these cells revealed that CD8 T cells were composed of both central and effector memory T cells, while CD4 T cells comprised mainly central memory T cells [23]. Interestingly, these T cell responses correlated with persistent control of mucosally administered SIV_{mac251} pathogenic virus. This control was obtained in the absence of detectable neutralizing antibodies [24]. In the present study, we evaluated the immunogenicity of this SHIV-based lentiDNA vaccine, which was adjuvanted with two homeostatic cytokines: IL-7 and IL-15. Our aim was to create favorable conditions for antigens and cytokines to elicit a high proportion of T cells with augmented potential for homeostasis and the generation of highly functional effector memory T cells. We found that our lentiDNA vaccine prototypes did efficiently co-express both vaccine antigens HIV-Env, SIV-Gag p27 (1476 for CAL-SHIV-IN⁻IRES IL-7 and 823 pg/mL for CAL-SHIV-IN⁻IRES IL-15) and the cytokines IL-7 and IL-15 (1654 and 125 pg/mL, respectively), which were released in the supernatant of transfected HEK 293T cells (Figure 1c,f and Figure 2A,B). These lower concentrations of cytokines are compatible with physiologic functions but not with cytokine storm-like induction [41]. To evaluate the function of IL-7 and IL-15 released in the supernatant of transfected cells, we used our lab-adapted PHPC assay on human PBMCs. We compared the activity of recombinant cytokines with that of cytokines harvested from the supernatants of transfected HEK 293T cells. Even though cytokines from the supernatants were not purified or concentrated, they increased the proportion of T cells by at least ten-fold as well as their long-term survival, confirming their functionality *in cellulo*. IL-7 therapy in SIV-infected macaques increased CD4 and CD8 T-naïve and memory subsets not only in peripheral blood but also in other compartments such as spleen, lymph nodes, lungs and kidneys, and facilitated their maintenance [42]. Similarly, IL-15 therapy in SIV-infected macaques under ART showed a proliferation of CD4 and CD8 Tem, able to disperse in extra-lymphoid compartments [43]. Additionally, ART-treated SIV_{mac251}-infected macaques multiply immunized with a DNA vaccine expressing SIV antigens along with IL-15 and IL-15R α elicited Ag-specific responses with both Tcm and Tem associated with inflammatory cytokine secretions. Interestingly, after ART interruption, vaccinated monkeys showed long-lasting partial control of the viremia, with one log decrease,

compared to unvaccinated macaques who developed AIDS after ART interruption [44]. These studies support the hypothesis that IL-7 and IL-15 cytokines, associated with our lentiDNA vaccine, have the potential to enhance the pool of Ag-specific memory CD4 and CD8 T cells. DermaVir vaccine comprised a pDNA expressing 15 HIV-1 antigens. This vaccine has been adjuvanted with IL-7 or IL-15 and used as a therapeutic vaccine. This vaccine was used to expand the HIV-specific memory T cell pools in patients already exposed to HIV-1 and developed both antibody and T cell responses. DermaVir-vaccinated patients failed to induce responses potent enough to fully suppress viral infection. DermaVir prototype was similar to our vaccine, except the genome was controlled by Tat-dependent SIV/HIV LTRs and ours, by the constitutive CAEV LTRs. Our vaccine prototypes expressed concomitantly the cytokine adjuvants with the vaccines antigens, while DermaVir did not. Gag pDNA delivered as DermaVir in mice significantly enhanced Gag-specific memory responses [29]. Similarly, SHIV-based pDNA delivered as DermaVir in rhesus macaques significantly enhanced Gag- and Env-specific central memory and effector memory T cells, with Th1 and Th2 cytokines, similarly to our lentiDNA vaccine [45].

BALB/cJ mice immunized with cytokine-adjuvanted lentiDNA developed higher frequencies of inflammatory cells secreting both IFN- γ and IL-2 starting 2 weeks after the boost (week 8 post-immunization), compared to mice immunized with the parental vaccine. This result suggested that co-expression of both IL-7 and IL-15 cytokines enhanced the elicitation of multifunctional antigen-specific T cells. Another study demonstrated that a DNA-based vaccine expressing the SIV-gag gene led to Ag-specific CD4 and CD8 T cells in vaccinated IL-15 KO mice, but CD8 absolute numbers were lower compared to those in wild-type mice [46]. In addition, these CD8 T cells had impaired cytotoxicity, as Granzyme B secretion was reduced compared to that in wild-type mice. This study highlighted that IL-15, in addition to DNA-based vaccine, is largely involved in the generation and maintenance of CD8 T cell responses as well as critical for their number, activity and function [46]. Finally, another recent intriguing report has highlighted the long-term protection afforded by deglycosylated SIV-Env immunization, which was associated with IL-15-mediated effector functions of T and NK cells [47].

Surprisingly, mice immunized with the parental lentiDNA, but not the cytokine- adjuvanted lentiDNA, produced HIV Env-specific IgG. This could have resulted from a shift of balance from Th2 to Th1 responses. In addition, since cytokine adjuvants were originated from rhesus macaques, their functions might not be compatible with mouse B cells.

The prime immunization of macaques with the parental and the cytokine-expressing lentiDNA vaccines did not show a detectable difference, as the responses were low. However, as in mice, the boost led to increased Gag-specific IFN- γ producing T cells in macaques immunized with the adjuvanted but not the parental lentiDNA vaccine. Because Gag-conserved epitopes have been described among individuals infected with HIV-1, this conserved protein is a promising target for an HIV vaccine [48]. In contrast, no detectable Env-specific IFN- γ producing T cells were found in macaques immunized with the parental or adjuvanted lentiDNA vaccine.

Interestingly, longitudinal characterization of antigen-specific CD4 and CD8 T cells showed a different evolution. While increased multifunctional CD8 T cells were detected in macaques immunized with the adjuvanted lentiDNA vaccine at late time points, no detectable increase was seen in the CD4 population. These findings confirmed those from our earlier studies showing that immunization of macaques with a single dose of lentiDNA elicited

long-term central and effector memory CD8 T cells but only central memory CD4T cells [23].

The production of antiviral cytokines such as IFN- γ , Granzyme B and MIP-1 β in macaques after the boost is particularly important for viral control and could lead to protection during a primary infection by killing infected cells before the setup of a viral reservoir. Moreover, a study has demonstrated that the induction of a combination of degranulation factor CD107a and MIP-1 β responses led to the inhibition of HIV-1 infection [49]. This phenomenon was also found in HIV-1 elite controllers [49].

The longitudinal evaluation of vaccine-specific antibodies against Env in both groups showed similar titers of peripheral IgG up to week 22 post-immunization. However, at week 40, a marked decrease in the Env-IgG titer was observed in the parental, but not in the adjuvanted, group of vaccinated macaques, suggesting that the cytokines helped to maintain plasma cells secreting Env-specific IgG during the memory phase, weeks 22–40 post-immunization. This humoral memory is important for the long-term control of chronic infectious disease. While this IgG response was not associated with detectable neutralizing activity against Tier-2 HIV-1_{JR-FL}, it exhibited clear ADCC activity, a function associated with HIV control [44]. As demonstrated in a number of macaque studies, neutralizing Abs are not essential to protect against SIV and, by extension, HIV-infection [23,24,50,51]. Vaccine-induced non-neutralizing serum and mucosal Abs with ADCC activity have shown inhibition of the infection after intrarectal challenge with SIV_{mac251} [23,24,50] or with SHIV89.6P [51]. This protection was also validated in humans, as ADCC activity was also found in HIV-1 infected non-progressor patients and one of the correlates of protection in the RV144 clinical trial [52]. Moreover, breast milk non-neutralizing Abs with ADCC capacity have been correlated with reduction of vertical transmission from viremic mothers to infants [53].

HIV is transmitted mucosally. IgA is important for the control of this type of transmission, and recent findings demonstrated that both IgA and IgG can block HIV-1 infection after mucosal exposure [54]. We evaluated the proportion of rectal IgA and IgG in vaccinated macaques. While in macaques immunized with the parental, non-adjuvanted prototype, IgA titers were essentially undetectable in rectal secretions, macaques immunized with the adjuvanted prototype showed clearly detectable HIV Env-specific IgA titers (up to 1:250) at multiple time points. By comparison, antigen-specific mucosal IgG titers were only transiently detected after the boost in the adjuvanted lentiDNA group but not the parental prototype. In addition, IgA responses were found augmented at later time points following a contraction period, a phenomenon reported by others [55]. We did not expect to find these humoral response discrepancies between mice and macaques. However, in our earlier studies, T cell but not antibody responses were readily detected in BALB/c mice immunized with lentiDNA prototype [34,56]. Cytokine co-expression with lentiDNA vaccine Ag did not boost the humoral responses. In summary, our CAL-SHIV-IN⁻IRES-cytokine lentiDNA vaccine and vaccination strategy elicited potent vaccine-specific, non-neutralizing antibodies with ADCC capacity in the periphery. Furthermore, a strong IgA response was observed in mucosal compartments of rhesus macaques. These humoral responses were durable, up to 40 weeks post-immunization (the end of monitoring) and were enhanced by the cytokines. In addition, while cellular responses to Env and Nef were minimal, Gag-specific central memory and

effector T-cell responses secreting Granzyme B and MIP-1 β were clearly elicited. Future studies will be needed to test whether such responses can contain challenges with pathogenic SHIVs to provide definite proof of the protective capacity of the immunity conferred by these vaccines and this original strategy.

Author Contributions: Conceptualization, Y.C.; Methodology, Y.C., F.V. and L.-A.L.; Software, L.-A.L.; Validation, Y.C. and F.V.; Formal Analysis, L.-A.L.; Investigation, L.-A.L., A.M.D., A.K., D.B. and P.X.; Resources, Y.C. and F.V.; Data Curation, J.G., Y.C. and F.V.; Writing—Original Draft Preparation, L.-A.L.; Writing—Review & Editing, L.-A.L., J.G., Y.C. and F.V.; Supervision, Y.C.; Project Administration, Y.C.; Funding Acquisition, Y.C. and F.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Leroy was supported by IDEX University Grenoble Alpes and Fulbright fellowship, and the study was otherwise jointly supported by the University Grenoble Alpes and the University of Louisiana at Lafayette New Iberia Research Center. Recombinant macaque cytokines and plasmids were provided by the Resource for Nonhuman Primate Immune Reagents (NIH 5R24OD010947).

Institutional Review Board Statement: The mouse study protocol was approved by the Ethics Committees of both the University Grenoble Alpes and the University of Louisiana at Lafayette (protocol 335 #5528 06/01/2016). For macaque studies, the protocols were performed according to NIRC standard operating procedures (with the exception of noted exemptions in the study protocol) and according to the “Guide” of Animal Use in Research. All animal study protocols were reviewed and approved by the University of Louisiana at Lafayette Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) under approval 2019-8743-030.

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the volunteer to publish this paper.

Data Availability Statement: Data are archived in PAVAL Lab. and the NIRC servers. <https://www.pavallab.com/> and <https://nirc.louisiana.edu/>.

Acknowledgments: We thank the Fulbright commission for their strong support and the staff of the New Iberia Research Center, University of Louisiana at Lafayette for their excellent care and handling of animals. We thank the UGA IDEX for the Ph.D. scholarship and for the participation in the work conducted both in Grenoble and Lafayette.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. Description of macaque groups.

Animal ID	Mamu-A*01 Allele	Mamu-B*08 Allele	Mamu-B*17 Allele	Body Weight (kg)	Age (yr) at Time of Study	Date of Birth	Gender	Group Assigned
A9N029	+	-	-	11.2	9.66	25 May 2009	Male	1
A11N081	-	-	-	17.7	7.67	24 May 2011	Male	1
DE3Z	-	-	-	11.6	10.06	1 January 2009	Male	1
A7N147	-	-	-	12.1	11.23	2 November 2007	Male	2
A10N143	+	-	-	10.4	8.11	15 December 2010	Male	2
DCIN	-	-	-	15.2	11.06	1 January 2008	Male	2

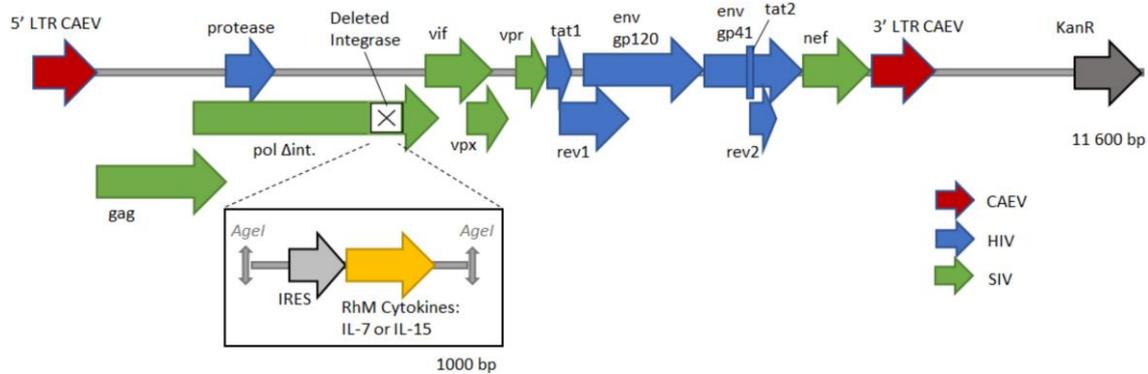


Figure A1. Schematic representation of the CAL-SHIV-IN⁻ IRES cytokine lentiDNA vaccines: CAL-SHIV-IN⁻ was derived from the genome of the chimeric, highly pathogenic SHIV_{KU2} as previously described [1]. A 1000 bp cassette, containing IRES sequence and rhesus macaque cytokine gene IL-7 or IL-15, was inserted into the integrase-deleted site in CAL-SHIV-IN⁻ genome, ligated by the Age I-restricted extremities.

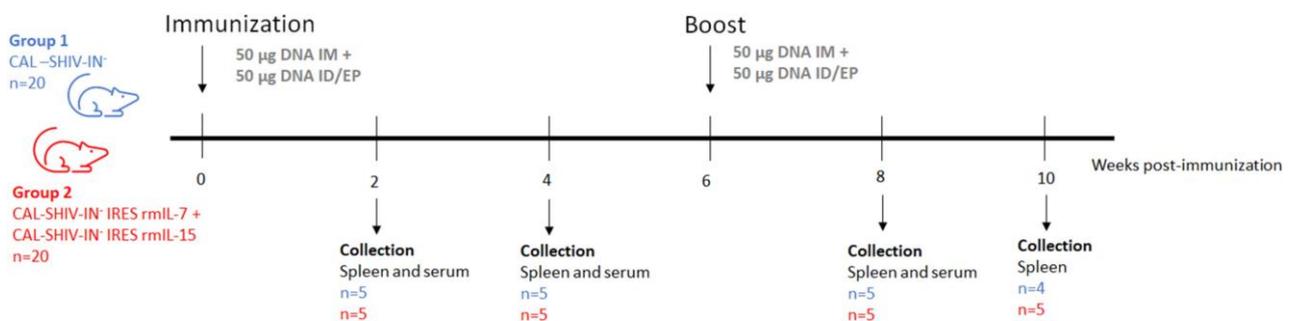


Figure A2. Immunization of BALB/cJ mice: Twenty mice per group were immunized with CAL-SHIV-IN⁻ vaccines (group 1) or co-immunized with CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15 (group 2) by intradermal route + electroporation (ID/EP), and by intramuscular route (IM) as described in materials and methods. A homologous vaccination booster was administered 6 weeks later. At weeks 2, 4, 8 and 10 post-immunization, spleens were harvested to monitor and evaluate the cellular responses and blood samples for the detection of HIV-specific Abs in serum.

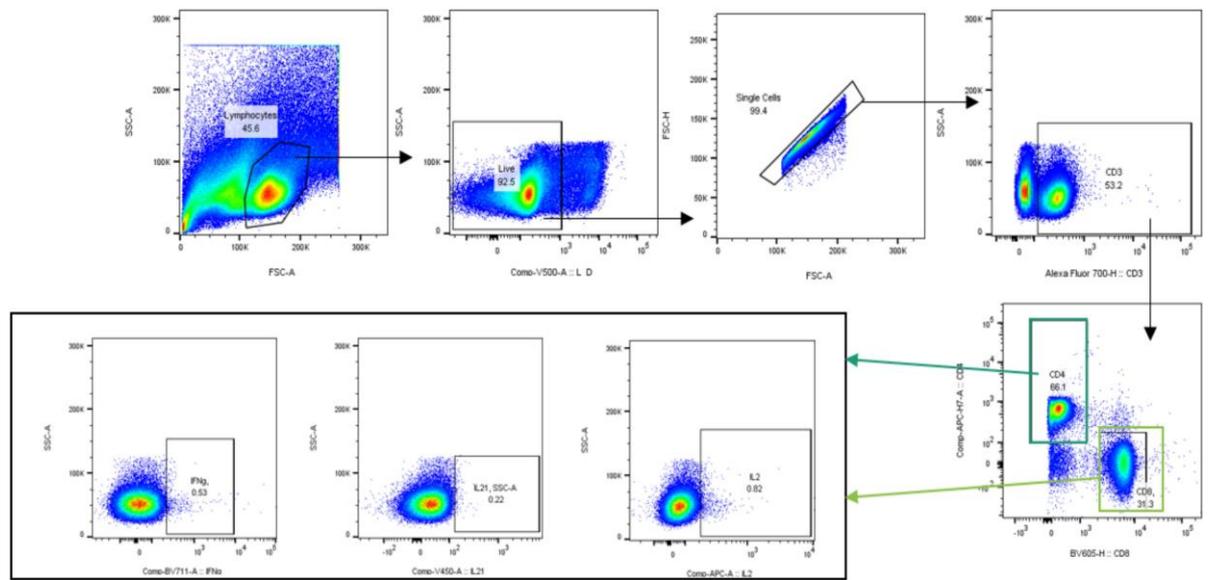


Figure A3. Gating strategy for mice splenocytes. Lymphocytes were gated among the splenocyte population, and alive, then single cells were selected. CD3⁺ cells were gated, and CD4⁺ or CD8⁺ cells isolated. Among CD4⁺ and CD8⁺, respectively, cytokine secretion (IL-2, IL-21 and IFN- γ) were characterized.

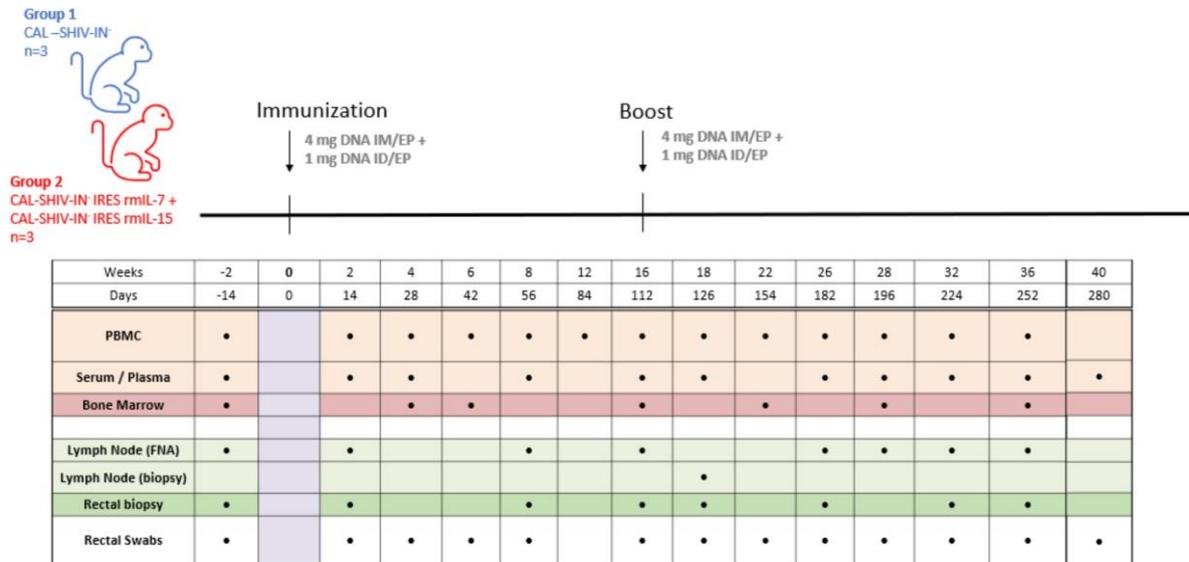


Figure A4. Immunization and sampling of vaccinated macaques: Three macaques per group were immunized with the CAL-SHIV-IN⁻ vaccine (group 1) or co-immunized with the CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 and CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15 (group 2) by ID/EP and IM/EP. Homologous vaccination booster was administered 16 weeks later. Different samples were harvested to monitor and evaluate the immune responses up to 40 weeks.

References

1. Whyte-Allman, S.-K.; Bendayan, R. HIV-1 Sanctuary Sites—The Role of Membrane-Associated Drug Transporters and Drug Metabolic Enzymes. *AAPS J.* **2020**, *22*, 118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Castro, S.; Colomer-Lluch, M.; Serra-Moreno, R. Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2018**, *34*, 739–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Excler, J.-L.; Kim, J.H. Novel prime-boost vaccine strategies against HIV-1. *Expert Rev. Vaccines* **2019**, *18*, 765–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sekaly, R.-P. The failed HIV Merck vaccine study: A step back or a launching point for future vaccine development? *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 7–12. [[CrossRef](#)]
5. McCarthy, M. AIDS vaccine fails in Thai trial. *Lancet* **2003**, *362*, 1728. [[CrossRef](#)]
6. Almond, N.; Kent, K.; Stott, E.; Cranage, M.; Rud, E.; Clarke, B. Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. *Lancet* **1995**, *345*, 1342–1344. [[CrossRef](#)]
7. Baba, T.W.; Jeong, Y.S.; Pennick, D.; Bronson, R.; Greene, M.F.; Ruprecht, R.M. Pathogenicity of Live, Attenuated SIV after Mucosal Infection of Neonatal Macaques. *Science* **1995**, *267*, 1820–1825. [[CrossRef](#)]
8. Learmont, J.C.; Geczy, A.F.; Mills, J.; Ashton, L.J.; Raynes-Greenow, C.H.; Garsia, R.J.; Dyer, W.B.; McIntyre, L.; Oelrichs, R.B.; Rhodes, D.I.; et al. Immunologic and Virologic Status after 14 to 18 Years of Infection with an Attenuated Strain of HIV-1—A Report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1715–1722. [[CrossRef](#)]
9. Zaunders, J.; Dyer, W.B.; Churchill, M. The Sydney Blood Bank Cohort: Implications for viral fitness as a cause of elite control. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2011**, *6*, 151–156. [[CrossRef](#)]
10. Adnan, S.; Colantonio, A.D.; Yu, Y.; Gillis, J.; Wong, F.E.; Becker, E.A.; Piatak, M., Jr.; Reeves, R.K.; Lifson, J.D.; O'Connor, S.L.; et al. CD8 T cell response maturation defined by anentropic specificity and repertoire depth correlates with SIV Δ nef-induced protection. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004633. [[CrossRef](#)]
11. Billingsley, J.M.; Rajakumar, P.A.; Connole, M.A.; Salisch, N.C.; Adnan, S.; Kuzmichev, Y.V.; Hong, H.S.; Reeves, R.K.; Kang, H.J.; Li, W.; et al. Characterization of CD8+ T cell differentiation following SIV Δ nef vaccination by transcription factor expression profiling. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Barouch, D.H. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2010**, *5*, 386–390. [[CrossRef](#)]
13. Gómez, C.E.; Nájera, J.L.; Perdiguero, B.; García-Arriaza, J.; Sorzano, C.O.S.; Jiménez, V.; González-Sanz, R.; Jiménez, J.L.; Muñoz-Fernández, M.A.; López Bernaldo de Quirós, J.C.; et al. The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11468–11478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abad-Fernandez, M.; Goonetilleke, N. Human cytomegalovirus-vectored vaccines against HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2019**, *14*, 137–142. [[CrossRef](#)]
15. Buchbinder, S.P.; Mehrotra, D.V.; Duerr, A.; Fitzgerald, D.W.; Mogg, R.; Li, D.; Gilbert, P.B.; Lama, J.R.; Marmor, M.; del Rio, C.; et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): A double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* **2008**, *372*, 1881–1893. [[CrossRef](#)]
16. Williams, M.; Ewing, D.; Blevins, M.; Sun, P.; Sundaram, A.K.; Raviprakash, K.S.; Porter, K.R.; Sanders, J.W. Enhanced immunogenicity and protective efficacy of a tetravalent dengue DNA vaccine using electroporation and intradermal delivery. *Vaccine* **2019**, *37*, 4444–4453. [[CrossRef](#)]
17. Hobernik, D.; Bros, M. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3605. [[CrossRef](#)]
18. Collins, D.R.; Gaiha, G.D.; Walker, B.D. CD8+ T cells in HIV control, cure and prevention. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 471–482. [[CrossRef](#)]
19. McBrien, J.; Kumar, N.A.; Silvestri, G. Mechanisms of CD8+ T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication.

- Eur. J. Immunol.*
2018, *48*, 898–914. [[CrossRef](#)]
20. Diehl, M.C.; Lee, J.C.; Daniels, S.E.; Tebas, P.; Khan, A.S.; Giffear, M.; Sardesai, N.Y.; Bagarazzi, M.L. Tolerability of intramuscular and intradermal delivery by CELLECTRA((R)) adaptive constant current electroporation device in healthy volunteers. *Hum. Vaccines Immunother* **2013**, *9*, 2246–2252. [[CrossRef](#)]
 21. Adam, L.; Tchitchek, N.; Todorova, B.; Rosenbaum, P.; Joly, C.; Poux, C.; Chapon, C.; Spetz, A.L.; Ustav, M.; Le Grand, R.; et al. Innate Molecular and Cellular Signature in the Skin Preceding Long-Lasting T Cell Responses after Electroporated DNA Vaccination. *J. Immunol.* **2020**, *204*, 3375–3388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 22. Young, J.L.; Dean, D.A. Electroporation-Mediated Gene Delivery. Electroporation-mediated gene delivery. *Adv. Genet.* **2015**, *89*, 49–88. [[PubMed](#)]
 23. Arrode-Bruses, G.; Moussa, M.; Baccard-Longere, M.; Villinger, F.; Chebloune, Y. Long-term central and effector SHIV-specific memory T cell responses elicited after a single immunization with a novel lentivector DNA vaccine. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Chebloune, Y.; Moussa, M.; Arrode-Brusés, G.; Ronfort, C.; Bose, D.; Gagnon, J.; Gumber, S.; Villinger, T.; Byrareddy, S.N.; Kozlowski, P.A.; et al. A single lentivector DNA based immunization contains a late heterologous SIVmac251 mucosal challengeinfection. *Vaccine* **2020**, *38*, 3729–3739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 25. Leonard, W.J.; Lin, J.X.; O’Shea, J.J. The gammac Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity* **2019**, *50*, 832–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 26. Lugli, E.; Brummelman, J.; Pilipow, K.; Roychoudhuri, R. Paths to expansion: Differential requirements of IRF4 in CD8(+) T-cell expansion driven by antigen and homeostatic cytokines. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 1281–1284. [[CrossRef](#)]
 27. Cieri, N.; Camisa, B.; Cocchiarella, F.; Forcato, M.; Oliveira, G.; Provasi, E.; Bondanza, A.; Bordignon, C.; Peccatori, J.; Ciceri, F.; et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* **2013**, *121*, 573–584. [[CrossRef](#)]
 28. Logerot, S.; Figueiredo-Morgado, S.; Charmeteau-De-Muylder, B.; Sandouk, A.; Drillet-Dangeard, A.-S.; Bomsel, M.; Bourgault-Villada, I.; Couëdel-Courteille, A.; Cheyner, R.; Rancez, M. IL-7-Adjuvanted Vaginal Vaccine Elicits Strong Mucosal Immune Responses in Non-Human Primates. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 614115. [[CrossRef](#)]
 29. Calarota, S.A.; Dai, A.; Trocio, J.N.; Weiner, D.B.; Lori, F.; Lisziewicz, J. IL-15 as memory T-cell adjuvant for topical HIV-1 DermaVir vaccine. *Vaccine* **2008**, *26*, 5188–5195. [[CrossRef](#)]
 30. Singh, V.; Gowthaman, U.; Jain, S.; Parihar, P.; Banskar, S.; Gupta, P.; Gupta, U.D.; Agrewala, J.N. Coadministration of Interleukins 7 and 15 with Bacille Calmette-Guérin Mounts Enduring T Cell Memory Response against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 480–489. [[CrossRef](#)]
 31. Chen, J.; Li, Z.Y.; Petersen, E.; Liu, W.G.; Zhu, X.Q. Co-administration of interleukins 7 and 15 with DNA vaccine improves protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* **2016**, *162*, 18–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 32. Conlon, K.C.; Miljkovic, M.D.; Waldmann, T.A. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* **2019**, *39*, 6–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 33. Hashimoto, M.; Im, S.J.; Araki, K.; Ahmed, R. Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *11*, a028464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Arrode, G.; Hegde, R.; Mani, A.; Jin, Y.; Chebloune, Y.; Narayan, O. Phenotypic and Functional Analysis of Immune CD8+ T Cell Responses Induced by a Single Injection of a HIV DNA Vaccine in Mice. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 2318–2327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 35. Sarzotti-Kelsoe, M.; Bailer, R.T.; Turk, E.; Lin, C.-L.; Bilska, M.; Greene, K.M.; Gao, H.; Todd, C.A.; Ozaki, D.A.; Seaman, M.S.; et al. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods* **2014**, *409*, 131–146. [[CrossRef](#)]
 36. Alpert, M.D.; Heyer, L.N.; Williams, D.E.J.; Harvey, J.D.; Greenough, T.; Allhorn, M.; Evans, D.T. A Novel Assay for Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity against HIV-1- or SIV-Infected Cells Reveals Incomplete Overlap with Antibodies Measured by Neutralization and Binding Assays. *J. Virol.* **2012**, *86*,

- 12039–12052. [[CrossRef](#)]
37. Forthal, D.N.; Finzi, A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infection. *AIDS* **2018**, *32*, 2439–2451. [[CrossRef](#)]
 38. Sereti, I.; Dunham, R.M.; Spritzler, J.; Aga, E.; Proschan, M.A.; Medvik, K.; Battaglia, C.A.; Landay, A.L.; Pahwa, S.; Fischl, M.A.; et al. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood* **2009**, *113*, 6304–6314. [[CrossRef](#)]
 39. Younes, S.-A.; Freeman, M.L.; Mudd, J.C.; Shive, C.L.; Reynaldi, A.; Panigrahi, S.; Estes, J.D.; Deleage, C.; Lucero, C.; Anderson, J.; et al. IL-15 promotes activation and expansion of CD8+ T cells in HIV-1 infection. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 2745–2756. [[CrossRef](#)]
 40. Cockerham, L.R.; Siliciano, J.D.; Sinclair, E.; O’Doherty, U.; Palmer, S.; Yukl, S.A.; Strain, M.C.; Chomont, N.; Hecht, F.; Siliciano, R.F.; et al. CD4+ and CD8+ T Cell Activation Are Associated with HIV DNA in Resting CD4+ T Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110731. [[CrossRef](#)]
 41. Coppola, C.; Hopkins, B.; Huhn, S.; Du, Z.; Huang, Z.; Kelly, W.J. Investigation of the Impact from IL-2, IL-7, and IL-15 on the Growth and Signaling of Activated CD4⁺ T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7814. [[CrossRef](#)]
 42. Leone, A.; Picker, L.J.; Sodora, D.L. IL-2, IL-7 and IL-15 as immuno-modulators during SIV/HIV vaccination and treatment. *Curr. HIV Res.* **2009**, *7*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 43. Picker, L.J.; Reed-Inderbitzin, E.F.; Hagen, S.I.; Edgar, J.B.; Hansen, S.G.; Legasse, A.; Planer, S.; Piatak, M.; Lifson, J.D.; Maino, V.C.; et al. IL-15 induces CD4+ effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 1514–1524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 44. Valentin, A.; von Gegerfelt, A.; Rosati, M.; Miteloudis, G.; Alicea, C.; Bergamaschi, C.; Jalah, R.; Patel, V.; Khan, A.S.; Draghia-Akli, R.; et al. Repeated DNA therapeutic vaccination of chronically SIV-infected macaques provides additional virological benefit. *Vaccine* **2010**, *28*, 1962–1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Cristillo, A.D.; Lisziewicz, J.; He, L.; Lori, F.; Galmin, L.; Trocio, J.N.; Unangst, T.; Whitman, L.; Hudacik, L.; Bakare, N.; et al. HIV-1 prophylactic vaccine comprised of topical DermaVir prime and protein boost elicits cellular immune responses and controls pathogenic R5 SHIV162P3. *Virology* **2007**, *366*, 197–211. [[CrossRef](#)]
 46. Li, J.; Valentin, A.; Ng, S.; Beach, R.K.; Alicea, C.; Bergamaschi, C.; Felber, B.K.; Pavlakis, G.N. Differential effects of IL-15 on the generation, maintenance and cytotoxic potential of adaptive cellular responses induced by DNA vaccination. *Vaccine* **2015**, *33*, 1188–1196. [[CrossRef](#)]
 47. Watanabe, S.; Fujino, M.; Saito, Y.; Ahmed, N.; Sato, H.; Sugimoto, C.; Okamura, T.; Hanaki, K.; Nakayama, E.E.; Shioda, T.; et al. Protective Immune Responses Elicited by Deglycosylated Live-Attenuated Simian Immunodeficiency Virus Vaccine Are Associated with IL-15 Effector Functions. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 1331–1344. [[CrossRef](#)]
 48. McGettigan, J.P.; Sarma, M.; Orenstein, J.M.; Porerantz, R.J.; Schnell, M.J. Expression and immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 Gag expressed by a replication-competent rhabdovirus-based vaccine vector. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8724–8732. [[CrossRef](#)]
 49. Freel, S.A.; Lamoreaux, L.; Chattopadhyay, P.K.; Saunders, K.; Zarkowsky, D.; Overman, R.G.; Ochsenauber, C.; Edmonds, T.G.; Kappes, J.C.; Cunningham, C.K.; et al. Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4998–5006. [[CrossRef](#)]
 50. Hidajat, R.; Xiao, P.; Zhou, Q.; Venzon, D.; Summers, L.E.; Kalyanaraman, V.S.; Montefiori, D.C.; Robert-Guroff, M. Correlation of vaccine-elicited systemic and mucosal nonneutralizing antibody activities with reduced acute viremia following intrarectal simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of rhesus macaques. *J. Virol.* **2009**, *83*, 791–801. [[CrossRef](#)]
 51. Xiao, P.; Zhao, J.; Patterson, L.J.; Brocca-Cofano, E.; Venzon, D.; Kozlowski, P.A.; Hidajat, R.; Demberg, T.; Robert-Guroff, M. Multiple Vaccine-Elicited Nonneutralizing Antienvelope Antibody Activities Contribute to Protective Efficacy by Reducing both Acute and Chronic Viremia following Simian/Human Immunodeficiency Virus SHIV_{89.6P} Challenge in Rhesus Macaques. *J. Virol.* **2010**, *84*, 7161–7173. [[CrossRef](#)]
 52. Kim, J.H.; Excler, J.L.; Michael, N.L. Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 423–437. [[CrossRef](#)]
 53. Mabuka, J.; Nduati, R.; Odem-Davis, K.; Peterson, D.; Overbaugh, J. HIV-Specific Antibodies Capable of ADCC Are Common in Breastmilk and Are Associated with Reduced Risk of Transmission in Women with High

- Viral Loads. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ruprecht, R.M.; Marasini, B.; Thippeshappa, R. Mucosal Antibodies: Defending Epithelial Barriers against HIV-1 Invasion. *Vaccines* **2019**, *7*, 194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Aliyari, Z.; Alami, F.; Mostafavi, T.; Nasrabadi, H.T.; Soleimanirad, J.; Charoudeh, H.N. The Roles of IL-2, IL-7, and IL15 Ligands in B Cells Development from Cord Blood Mononuclear Cells. *Iran. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2015**, *5*, 155–160.
56. Hegde, R.; Liu, Z.; Mackay, G.; Smith, M.; Chebloune, Y.; Narayan, O.; Singh, D.K. Antigen Expression Kinetics and Immune Responses of Mice Immunized with Noninfectious Simian-Human Immunodeficiency Virus DNA. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14688–14697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article 2

Precursor with highly proliferative capacity (PHPC) specific memory T cells for durable protection against pathogens

Laury-Anne Leroy, Diana Noueihed, Maha Moussa, Jean Gagnon, Corinne Ronfort and Yahia Chebloune

Objectif : Il n'existe pas de méthode approuvée pour évaluer l'immunité protectrice durable induite par le vaccin. Au cours de l'infection/vaccination naturelle, les cellules T naïves amorcées avec l'antigène subissent des processus de différenciation/maturation hautement orchestrés. La force de la stimulation antigénique en présence de cytokines homéostatiques dicte la différenciation cellulaire en cellules T précurseurs à haute capacité de prolifération (PHPC), cellules T à mémoire centrale (T_{CM}), les lymphocytes T à mémoire effectrice (T_{EM}) et les effecteurs terminaux (T_{EF}). Alors que les cellules T effectrices à courte durée de vie permettent un contrôle initial de l'infection, les PHPC, moins différenciées, sont dotées d'une survie, d'une capacité de renouvellement et de propriétés protectrices améliorées. Nous avons émis l'hypothèse que la présence de PHPC spécifiques du vaccin, qui prolifèrent vigoureusement et produisent des cytokines en réponse à la restimulation tardive de l'antigène, pourrait être corrélée à une protection à long terme.

Cette étude a donc eu pour but la recherche de cellules précurseurs remobilisable chez des donneurs vaccinés ou ayant contracté une infection, par l'essai PHPC mis en place dans notre laboratoire. Les PBMCs de huit donneurs ont été pour cela isolés, puis stimulés par l'antigène d'intérêt et mis en culture pendant 12 jours en présence de cytokines homéostatiques permettant la maintenance des cellules spécifiques mémoires ainsi que leur différenciation en cellules T effectrices mémoires, et entraînant les cellules effectrices vers l'apoptose.

Résultats : Nous avons mesuré les lymphocytes T à mémoire effectrice immédiate et les PHPC circulants spécifiques de l'Ag dans des échantillons de sang de huit volontaires humains ayant des antécédents connus d'infection/convalescence et de statut vaccinal. Les PBMC ont été utilisés pour évaluer les cellules T effectrices sécrétant de l'IFN- γ à l'aide du test ELISpot IFN- γ de référence. Les réponses PHPC ont été quantifiées par une lecture similaire après 12 jours de culture de PBMC en présence d'antigène et de cytokines homéostatiques (IL-2, IL-7 et IL-15). Ces tests ont été utilisés pour évaluer les réponses

contre les antigènes du virus varicelle-zona (VZV), de la grippe (Flu) et du poliovirus (PV) comme modèles d'infections aiguës ; tandis que les antigènes du virus de l'hépatite B (VHB) et de *Mycobacterium tuberculosis* (Tb) ont été utilisés comme modèles d'infection chronique.

Nous avons détecté la persistance des lymphocytes T à mémoire effectrice des décennies après la vaccination/l'infection contre tous les antigènes testés. Non seulement les vaccins contre le VHB, le BCG et la polio, mais aussi l'infection naturelle par le VZV ont induit un pool de cellules T mémoire à longue durée de vie (PHPC) qui se différenciaient *ex vivo* en T_{CM} et T_{EM} après l'exposition à l'antigène, offrant une protection à long terme. Au contraire, l'antigène Flu et les cytokines homéostatiques n'ont pas réussi à induire des PHPC mesurables spécifiques à l'antigène.

Cette étude permet d'établir un corrélat d'immunité protectrice à long terme contre les agents pathogènes en utilisant le test PHPC comme outil de présélection chez les volontaires exposés et/ou vaccinés.

Precursor with highly proliferative capacity (PHPC) specific memory T cells for durable protection against pathogens

Laury-Anne Leroy, Diana Noueihed, Maha Moussa, Jean Gagnon, Corinne Ronfort and Yahia Chebloune

PAVAL Lab., USC INRAE/UGA 1450, 570, rue de la chimie, 38400, Université Grenoble Alpes, France ;
Correspondence: yahia.chebloune@inrae.fr; yahia.chebloune@univ-grenoble-alpes.fr; Tel.: +33456520866

Abstract

The specificity, longevity and effectiveness of antigen-specific T cell immune responses induced by natural infections and/or vaccination are highly variable. However, while short-lived, terminally-differentiated effector T cells achieve the initial control of infection, long-lived, less differentiated precursor T cells with high proliferation capacity (PHPC) are dotted with enhanced survival, renewal capacity and protective properties. We hypothesize that elevated PHPC proportion in PBMCs can be used as a predictive marker for lasting protective immunity. In this project, we measured circulating, Ag-specific effector memory T cells and PHPCs in blood samples up to nine human donors with a known history of cleared infection and vaccination. We compared the responses against three models of acute infections: *Influenza virus* [Flu], *Varicella-zoster virus* [VZV] infections and *Poliovirus* [PV]vaccination. Likewise, we chose *Hepatitis B virus* [HBV] and *Mycobacterium tuberculosis* [TB] as models of chronic infections. We used the classical IFN- γ ELISPOT assay to detect IFN- γ secreting effector memory T cells. PHPC responses were quantified by similar readout after 12 days PBMCs culture in presence of antigen and homeostatic cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) known to expand this subset *in vivo*. Our results demonstrated the persistence of circulating effector memory T cells, years after infection clearance or vaccination against all five tested pathogens (Day 1 IFN- γ ELISPOT). However, while a significant increase in IFN- γ secreting cells was measured after 12 days of culture in response to PV, HBV, BCG and VZV antigenic stimulation, there was no expandable INF- γ producing T cells against Flu antigens. These results clearly show differential capacities of both resolved infections and vaccinations at inducing PHPCs. This type of evaluation could be used as marker for perdurance of protective immunity in exposed/vaccinated human subjects.

Introduction

Vaccines are one of the most important discoveries in the fight against acute and chronic infectious diseases. They allow the eviction of 2 to 3 million lives each year, since the first works of Bernoulli, Jenner then Pasteur. Vaccination has enabled the eradication of smallpox in the 80's, and the reduction of 99% of poliomyelitis infections since 1988, from 350,000 to less than 200 cases by the end of 2019

according to UNICEF sources. The main principle of vaccination is to administer the weakened pathogen, or part of it, so that it is not harmful to the recipient. Vaccination mimics the primary infection, leading to the pathogen recognition, its elimination then memorization. Thus, once encountering the wild pathogen, specific memory cells previously established after vaccination will be recircularized quickly, in large numbers and with an enhanced specificity for the pathogen. One of the critical points of vaccination, in addition to its safety, must be its effectiveness and its capacity to confer a long-lasting immune response over time (memory response). Over time, different vaccination strategies have emerged. These are based on the type of responses put in place, conferred by humoral, neutralizing antibodies, or directed towards a cytotoxic, cellular response (**Table 1**).

Efficient vaccines against acute infection induce immediate immune responses composed of neutralizing antibodies and/or effector cytotoxic T cells that rapidly contain the infection and epidemics. This type of immunity was found to be insufficient in controlling chronic infectious diseases. Indeed, chronic infections are associated with pathogens exhibiting various strategies that help them escape and resist the host immune responses [256, 257]. Longevity and specificity of adaptive immunity are critical for durable protection against chronic infectious pathogens. During natural infection or vaccination, naïve T cells are primed by antigen and undergo highly-orchestrated differentiation and maturation processes [258, 259]. The strength of antigen stimulation in presence of physiologic homeostatic cytokines like IL-7, IL-15 and IL-2 dictates cell differentiation into precursor T cells with high proliferation capacity (PHPC), central memory T cells (T_{CM}), effector memory T cells (T_{EM}) and terminal effectors (T_{EFF})[260]. High and continuous antigen exposure, as in acute infection, is associated with increased effector response as it promotes high differentiation towards effector type of cells. Contrariwise, the process of memory cell generation requires limited antigen exposure in presence of specific cytokines promoting the renewal and maintenance of different memory subsets [261-263].

T cells comprise a heterogeneous pool of cells ranging from long-lived PHPCs to polyfunctional terminal effectors (T_{EFF}) of shorter lifespan [264]. Recently a particular type of precursor, stem cell-like memory T cells (T_{SCM}) multipotent with “stemness” properties, has been identified. These low frequency cells (< 4% of the total T cells in peripheral blood) were shown to be minimally differentiated with similar surface markers expression to naïve cells. Following antigen encounter T_{SCM} can differentiate into central memory (T_{CM}) → effector memory (T_{EM}) cells → terminal effectors (T_{EFF}), respectively [133, 261, 265]. *In vitro* studies have shown that T_{SCM} generation is mediated by IL-7 and IL-15 stimulation, these cytokines induce the proliferation of memory T cells in absence of

antigen, which is essential for the preservation of Ag-specific cells and maintenance of lymphocyte homeostasis (ability to maintain, differentiate and generate memory cells)

Since precursor T cells, including T_{SCM} , were shown to expand in absence of antigen, the focus of some studies was to monitor their prevalence following infection and/or vaccination. Single dose of yellow fever or small pox vaccines was associated with life-long immunity in humans [266, 267]. Yellow-fever specific $CD8^+$ T cells with precursor phenotype were detected in human subjects (38 out of 41) following 35 years post-vaccination [268]. While total specific $CD8^+$ T cells frequencies decreased with time, $CD8^+ T_{SCM}$ were maintained [266]. Poliomyelitis eradication not only correlated with an effective polio-specific neutralizing antibody, but also a long-lasting cell mediated polyfunctional $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell response [269]. This type of cellular response was induced by other vaccines. For instance, BCG-induced naïve-like memory T cells ($CD44^{lo} CD62L^{Hi}$) were able to replenish effector T cells ($CD44^{Hi} CD62L^{lo}$) with superior functional activity and protective potential against viral protein compared to initial effector T cells [270-274]. The characteristics of these cells are thus consistent with the antigen specific $CD4^+ T_{SCM}$ cells, distinct from bulk $CD4^+$ naïve T cells (T_N) and share common features with TB-specific tetramer⁺ T_{CM} and T_{EFF} cells [272]. Also, vaccination with the recombinant subunit HBV vaccine efficiently induced long-term, HBV-specific cell-mediated immunity with both proliferative and cytokine-secreting $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, mainly $INF-\gamma$ and IL-5 [275]. Contrariwise, vaccination with inactivated influenza virions, containing the purified hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) antigens from the four influenza virus strains recommended by the WHO induces short-lived protection against flu, raising the need for re-vaccination each year. This means that $CD8^+$ T cells elicited by influenza vaccine do not share the same properties of those elicited by smallpox and YF vaccines [276-278].

Based on previous studies, precursors T cells, with stemness, self-renewal and long-lasting capacity can be a critical element for the long-term control of infectious disease after vaccination as it already been linked with viremia control [279, 280]

It is feasible to verify the immune status of persons vaccinated by the seroconversion test, consisting in titrating the circulating antibodies set up after vaccination. On the other hand, to date, there are no tests allowing the detection of a specific cellular immunity, making possible the demonstration of recall and proliferation capacity of vaccine-specific memory cells, reflecting its capacity of protection.

Thus, using the PHPC detection test set up by the laboratory could make possible the identification of this *in vitro* recall of memory cells induced by the *in vivo* infection / vaccination in the tested patient.

In this paper, we assess the effectiveness of immunization of four licensed vaccines (Engerix B, GSK; Polish BCG vaccine, Sanofi Pasteur - MSD , Imovax Polio, Sanofi Pasteur; and Vaxigrip Tetra, Sanofi Pasteur; respectively) by inducing persistent and protective immune response against pathogenic antigens (*Hepatitis B virus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Poliovirus* and *Influenza virus*, respectively). Furthermore, we evaluate the immune response against natural infection with varicella zoster virus and influenza virus.

Disease	Disease causing agent	Vaccine	Memory Cells
Poliomyelitis	Poliovirus	Inactivated Polio + adjuvant	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ PHPC cells
Hepatitis	Hepatitis B virus	Recombinant DNA (Engerix)	CD8 ⁺ PHPC cells
Tuberculosis	Mycobacterium Tb	Live attenuated M. Bovis (BCG)	CD4 ⁺ T _{SCM} cells
Flu	Influenza virus	Inactivated fragmented virion (VaxigripTetra)	Bystander T cells

Table 1. Immunological memory in response to vaccination.

Material and Methods

1.1 Antigen Preparation

The five following commercial vaccines were used as antigenic source to stimulate PBMCs during assays:

The Bacille-Calmette-Guérin (BCG) vaccine (C5632AA, Sanofi-Pasteur) consist of a live-attenuated *Mycobacterium bovis* bacterial solution (50 µg/0.1 mL – 1.5-6.10⁵ viable units of Moreau (Brazil) strain. The used bacteria are weakened *Mycobacterium bovis* that usually infects cows and other animals. It is closely related to *Mycobacterium tuberculosis* but does not cause productive pathogenic infection in healthy humans. The bacterial suspension was first inactivated at 60°C for 1 hour, and then sonicated with 5 pulses of one second each. Between each pulses, the suspension was incubated 2-3 min on ice to avoid overheating the vaccine solution due to physical acceleration. Finally, the inactivated/sonicated bacterial solution was aliquoted and stored -20 °C.

VARILRIX (A7OCD348D, GSK) and VARIVAX (Sanofi Pasteur) are composed of lyophilized live-attenuated Oka/Merck VZV strain >1350 UFP/0.5 mL and $10^{3.3}$ UFP/0.5 mL, respectively. Lyophilized vaccines were first resuspended using assigned diluent to obtain homogeneous suspension and then heat inactivated at 56°C, for 45 min to abrogate the infectivity of the virus while preserving its immunogenicity. Aliquots of inactivated virus were conserved at -20°C.

IMOVAX POLIO, (P3H9009M, Sanofi-Pasteur) contains inactivated mixture of three Polioviruses: types I Mahoney strain (40 UD), type II MEF strain (8 UD), type III Sockett (Sanofi Pasteur) strain (32 UD). In order to eliminate the formaldehyde agent required to inactivate viruses, reconstituted vaccine was sterilely transferred into a dialysis tube (MIGFT020, mini-GeBaflex-tube) enabling concentration of viral proteins between 6-8 kDa MW while other vaccine components were excluded into an extra-tubular compartment containing PBS. After dialysis, the suspensions were distributed into aliquots and stored at -20°C.

Vaxigrip Tetra, (T3J101V, Sanofi-Pasteur) fragmented, inactivated flu vaccine from 2020/2021 season and containing 4 strains:

A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 - analogue strain: 15 µg HA;

A/Hongkong/2671/2019 (H3N2) - analogue strain: 15 µg HA;

B/Washington/02/2019 - analogue strain: 15 µg HA;

B/Phuket/3073/2013 - analogue strain: 15 µg HA

Vaccine was aliquoted and stored at -20°C without further manipulation.

And ENGERIX B (AHBVC876AA, GSK) subunit vaccine (20 µg/mL) was aliquoted and stored at -20°C without further manipulation.

1.2. Characteristics of donors enrolled in the study.

Blood samples were collected from 2 males and 7 females healthy human donors from 23 to 66 years old, with known vaccination history against tuberculosis, varicella, poliomyelitis, influenza and hepatitis B (**Table 2**). Thirty milliliters of fresh blood from each donor were collected in commercial EDTA pretreated tubes (BD). The buffy coat of white blood cells containing leukocytes was harvested, red blood cells were lysed and PBMCs frozen in liquid nitrogen.

Donors	Age	Gender	HBV	Flu
1	66	M	Enerix B	VaxigripTetraR
2	28	F	Enerix B	Infection
3	23	F	Enerix B	Infection
4	29	F	Enerix B	VaxigripTetraR
5	59	F	Enerix B	VaxigripTetraR
6	30	F	Genhevac B (prime) HBvaxPro (boost)	VaxigripTetraR
7	24	M	HBvaxPro	Infection

Table 2. Characteristics of studied donors PBMCs.

1.3. Detection of IFN- γ -producing cells by ELISPOT assay.

We used a commercial human ELISPOT kit (Mabtech, France) to evaluate IFN- γ -secreting cells in response to antigens from the different vaccines solutions. Briefly, 2.5×10^6 thawed PBMCs per well were incubated for 18 to 20 hours with BCG, VZV, Polio, Flu or HBV vaccines, medium alone (used as negative control), or medium containing Concanavalin A (used as positive control) (Fig. 4). Spots were counted using an automated ELISPOT reader system (Bioreader 100 β , Biosys). Results are presented as mean number of IFN- γ spot forming cells (SFC) per million PBMCs and were calculated from triplicate wells after subtracting the mean number from triplicate control wells (medium alone). Samples were scored as positive when the net adjusted counts exceeded 50 SFCs per million PBMCs.

1.4. Detection of precursors with high proliferative capacity using PHPC assay.

PBMC, resuspended in serum-free AIM-V medium (Gibco) were seeded into 24-well tissue culture plates at a density of 1.10^6 cells/ml/well in presence or absence of stimulatory antigens (Supplementary Table 2). On day 3, cultures were supplemented with simian IL-2 (10 U/ml, Sigma Aldrich) only and on day 7 with a cocktail containing simian IL-2 (10 U/mL), IL-7 (500 ng/mL, gifted from Cytheris, Yssy-les-Moulineaux, France) and IL-15 (10 U/ml, from the Resource for NHP immune Reagents)) (Fig 4, A). On day 11, cells were washed, counted and used ELISPOT assay.

Alive PBMCs (2×10^4) were seeded in triplicate into ELISPOT wells to quantify the number of specific-effector cells secreting IFN- γ and that were expanded from precursors (PHPC) that proliferated and differentiated during the culture with cytokines and antigens. The procedure of detection of IFN- γ producing cells is exactly as here above described for the ELISpot assay (Fig. 4, B). Number of specific-effector cells producing IFN- γ and that were expanded from precursors (PHPC) that proliferated and differentiated during the culture with cytokines and antigens were scored.

1.5. Cell Viability Test

PBMCs were cultured for 12 days in the conditions of PHPC assay previously described and stimulated with HBV or Flu antigens. At various time points (day 1, -3, -5, -7, -9, -10, -11 and -12) the viability of cultured cells were characterized using Luna automated cell counter (Logos biosystem) with Acridine Orange viability dye.

1.6. Data analysis

The mean number of spots from duplicate or triplicate conditions was adjusted to 10^6 PBMC. Data are presented as ELISpot counts and PHPC counts. The PHPC counts (net spots/million PBMCs) were calculated by normalizing the mean of unstimulated cells triplicates to the mean of each vaccine stimulated cells triplicates.

1.7. Statistical analysis

Statistics was performed using GraphPad Prism software (version 8.4.3) . T-test was used to assess differences in net spots/million PBMC detected by ELISPOT and PHPC assays. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

1.8. Ethics Statement

All donors PBMCs were used in accordance with the guidelines of the EU Directive XX/XXX/XXX as published in the French Official Journal XXXXX for experiments using human PBMCs. The study plan was reviewed by the Regional Ethics Committee of XXXX (XXX, France) and approved under permit protocol number XXX.

Results

Detection of Ag-specific IFN- γ production by ELISPOT and cultured PHPC assays To determine whether vaccines can potentially induce specific T-cell memory responses with long-lived, renewable precursor cells, we first assessed PHPC assay using PBMC from one donor previously vaccinated against *Hepatitis B Virus*, *Influenza virus*, *Poliovirus* and *Mycobacterium tuberculosis*) and previously infected with *Varicella Zoster viruse* during childhood. IFN- γ ELISPOT at day 1 and day 12 cultured PHPC counts were evaluated in response to stimulation with the different licensed vaccines, for which stimulation concentration was previously determined (data not shown)... The mean number of ELISPOT counts (net spots/million PBMCs) in response to HBV, Polio, BCG, VZV and Flu was 360, 20, and 86, 46 and 276 respectively (**Fig. 1, A–E**). The mean number of PHPC counts (net spots/million PBMCs) in response to HBV (3383 spots/million PBMCs), PV (5816 spots/million PBMCs), BCG (4050 spots/million PBMCs), VZV (2000 spots/million PBMCs) and Flu (0 spots/million PBMCs) was approximately 9-fold (p 0.0225), 290-fold (p 0.0062), 47-fold (p 0.0014) and 43-fold (p 0.0776) higher than those detected by the ELISPOT assay, respectively (**Fig. 1, A–D**). The PHPC results did not simply reflect a proportional increase of the ELISPOT counts. In fact, culture stimulated with flu antigenic peptides showed no spots on day 12 compared to day 1. To confirm that the PHPC assay was not just an “ELISPOT assay with increased sensitivity,” we examined the relationship between the two assays. No correlation was found between ELISPOT and PHPC counts in response to HBV, Polio, BCG, VZV and Flu (p 0.9607, p 0.2803, p 0.0933, p 0.7378 and p 0.539, respectively) (**Supplementary Fig. 1, A–E**). These results suggest that the PHPC assay is not only quantitatively but also qualitatively different from the ELISPOT assay, confirming that different T cell populations are being evaluated.

According to the observed results, vaccines against HBV, PV, TB, and VZV show proliferation of long-lasting, specific T cells after 12 days culture, no matter the characteristic of infection (acute or chronic). However, Flu vaccine seems not to induce any PHPC, as no specific-IFN- γ secreting is revealed after the cultured ELISpot. This can be explained as the specific, effector memory T cells restimulated by the vaccines antigens at day 1 has differentiated into short-life effector cells and died from apoptosis during the extended 12 days culture.

In order to confirm these interesting results, we selected Hepatitis B vaccine as chronic example of infection, as well as Flu vaccine for the acute infection. In one hand, we followed the cultured, stimulated PBMCs to characterize the cell viability over time.

In another hand, we repeated the assays in the same conditions with multiple donors to extend the repeatability of the results obtained with our single donor.

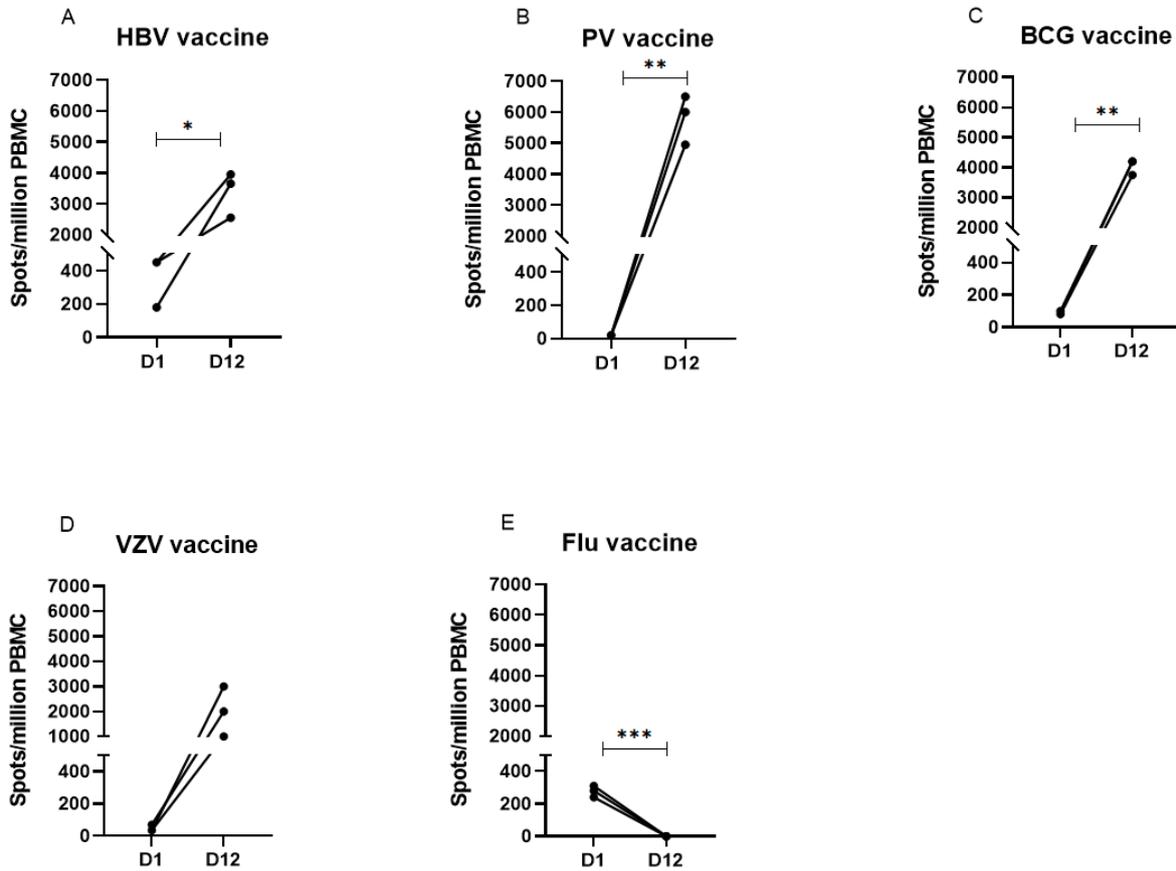


Figure 1: **IFN- γ secreting cells in response to licensed vaccines.** PBMCs were stimulated for 18-20h before (D1) and after 11 days of culture in presence of vaccines antigens and homeostatic cytokines (D12). Numbers of IFN- γ producing cells obtained per million of PBMCs against HBV (A), Poliovirus (B), BCG (C), VZV (D) and Flu (E) are represented

1.1. Longitudinal study of HBV- and Flu-stimulated PBMCs viability

To determine whether the lack of detection of PHPC responses in Flu antigen stimulated PBMCs was not resulting from toxicity and cells death during the 12 days culture, we longitudinally compared the viability of cell stimulated with HBV and Flu vaccine. Data in **Figure 2** clearly show no substantial difference were observed between the two stimulating conditions, with a high cell-viability at D12 for PBMCs stimulated with HBV (88.9 %) and Flu (94.5 %). These results prove that the lack of Flu-specific PHPCs does not result from generalized cell death during the 12 days of culture. Secondly, it is also possible to follow the cell expansion and apoptosis led by vaccine antigens and homeostatic cytokines. Hence, from day 3 - where the IL-2 is added, to day 7, a decrease of the cell viability is observed, due to the activation and differentiation of the specific, short living effector cells. At day 7 to day 9, the addition of the homeostatic cytokines led to the differentiation of the memory subsets, and their expansion.

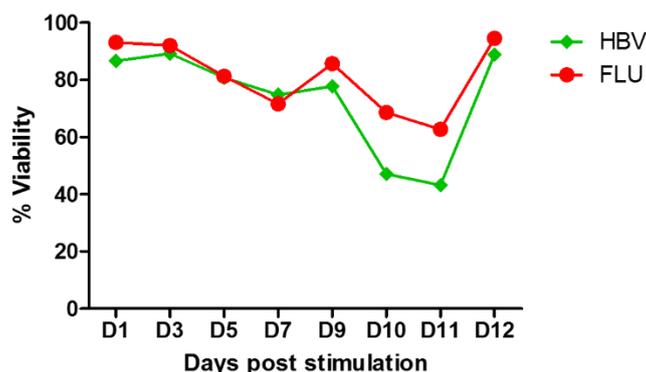


Figure 2. Longitudinal examination of cell viability following stimulation with HBV or Flu vaccines antigens. PBMCs were cultured in the conditions of PHPC assay in presence of homeostatic cytokines IL-2, IL-7 and IL-15, and stimulated with HBV or Flu antigens. Percent of viability was measured at the indicated time points with a fluorescent viability dye.

1.2. HBV- and Flu-specific T cell response in vaccinated donors

To determine if the same profile of immune response is generalized in vaccines, assays were repeated in several subjects. The responses against HBV in nine healthy vaccinated donors as well as six donors that have been infected and/or vaccinated by influenza in the past were examined. Overnight INF- γ ELISPOT of the nine HBV-vaccinated donors showed similar profile to donor one, here spots increased from a mean of 27.6 on D1 to 634.1 spot/million PBMCs on D12 (**Fig. 3, A**). In parallel, PBMCs of six healthy donors who previously encountered influenza *via* natural infection and/or vaccination were cultured in presence of Flu vaccine. Overnight INF- γ ELISPOT of these donors showed similar profile to the previous donor where spots decreased drastically from 53.9 on D1, to 0 spot/million PBMCs on D12, (**Fig. 3, B**)

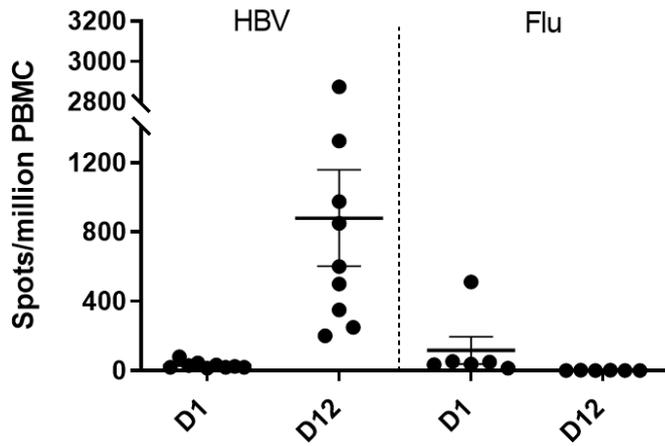


Figure 3. IFN- γ secreting cells in response to HBV and Flu vaccines on several donors. PBMCs from 9 donors (HBV) and 6 donors (Flu) were stimulated for 18-20h before (D1) and after 11 days of culture in presence of vaccines antigens and homeostatic cytokines (D12). Numbers of IFN- γ producing cells obtained per million of PBMCs against HBV (left), and Flu (right) are represented (n=1, in duplicate, normalized with unstimulated PBMCs)

Discussion

The durability of protective efficacy against pathogens is one of the outstanding qualities of vaccination. Unfortunately, there is no approved method to evaluate whether vaccine-induced immune responses are associated with durable protection. Our hypothesis is that the presence of vaccine-specific long-lasting precursor memory T cells, that can vigorously proliferate, self-renew and produce antiviral cytokines in response to late antigen re-stimulation, might correlate with long-term protection. The gold standard method for IFN- γ -secreting specific T cell enumeration is the ELISpot assay; however, it does not evaluate long-term memory responses. In this study, we evaluated the establishment of PHPC as well as their recall capacity after specific re-stimulation with five licensed human vaccines. Analysis of vaccine- or infection-induced T cell responses performed decades after the first encountered stimulation was repeated among several donors and independent experiments to ensure the reproducibility of obtained responses. Data presented here show that HBV, PV and BCG vaccines have not only promoted the maintenance of vaccine specific IFN- γ -secreting memory effector T cells but also the development and maintenance of vaccine-specific precursor memory cells producing central memory (T_{CM}) and effector memory (T_{EM}) with immediate as well as readily inducible effector functions upon antigenic and homeostatic stimuli, and able to proliferate.

These responses persisted several years post-immunization and comprise a fraction of immediate effector memory (T_{EM}), central memory (T_{CM}) and precursor memory T cells with high proliferative capacity (PHPC). The ability of these vaccine-specific precursor cells recall and to differentiate into.

On the contrary, Flu vaccination failed to elicit this type of vaccine-specific persistent T cells. IFN- γ -secreting T cells highlighted by ELISpot at day 1 showed the presence of short-living effector T cell, differentiated after the antigens stimulation but undergo apoptosis within 5 days. However, IFN- γ -secreting T cells detected following the 12 days culture resulted from expansion and differentiation of precursors into central memory, transitional memory and then effector memory T cells [68]. These cells are more resistant to apoptosis-mediated cell death and do persist for long period of time. Our data clearly provide the demonstration of long-term persistence of readily mobilizable T cell responses after many decades post-immunization, near 60 years ago for BCG and PV vaccination, and 25 years ago for HBV for one studied donor. This type of immunity has been observed following vaccination against smallpox since protective, long-lasting memory CD8⁺ T cells were detected in vaccinees [281, 282]. Interestingly, in another study, HBV-specific expandable memory T-cells, likely central and effector memory, were detected in half of HBV vaccinated subjects, 15-20 years post-immunization. Regardless of the wane of protective antibodies with age, Bauer et al. found that these elderly vaccinated individuals had significant proportions of HBV-specific memory T cells that were considered to be protective [283]. Mpande et al. recognized that TB-specific tetramer⁺ T_{SCM}, central memory (T_{CM}) and effector memory (T_{EFF}) T cells were boosted following TB infection [273]. Furthermore, TB-specific effector T cells peaked during primary TB infection phase and decreased steadily later on, unlike TB specific T_{SCM}, that were induced and maintained at consistent levels in the periphery [284]. Interestingly enough, stimulation with PV antigen that has shown minimal numbers of effector memory IFN- γ producing cells after overnight stimulation (25 SFU/10⁶ PBMCs) induced the highest increase of these cells (241-fold increase) to reach 5725 SFU/10⁶ PBMCs after 12 days culture. BCG antigen stimulation that showed four-time higher number (86 SFU/10⁶ PBMCs) in the overnight assay has induced only a 50-fold increase at 12 days and HBV showing the highest numbers (224 SFU/10⁶ PBMCs) in the overnight assay has shown only 10 times increase after 12 days. Whether there is a direct correlation between the antigen-specific effector memory T cells number and the PHPCs frequency remains to be demonstrated. This might indicate that PHPC generation and maintenance is not only affected at the early stages of immune elicitation but also at later stages following immunity setup. In HIV vaccine model, a single immunization of macaques with a lentivector DNA vaccine CAL-SHIV-IN⁻ developed by our laboratory has shown that all vaccinated animals developed vaccine-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells with immediate effector functions but also PHPC T cells, able to generate highly potent HIV-specific central memory (CD28⁺CD95⁺) and effector memory (CD25⁻CD95⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T cells. CD8⁺T_{SCM} specific to the RM-9 epitope bared by Nef as well as Nef-specific T_{CM} were detected by the PHPC assay and this phenotype was confirmed by flow cytometry following 12 days of culture in the presence of homeostatic cytokines and antigens [285]. These long-living precursors, mainly CD8⁺ T_{SCM}, with augmented proliferative and

polyfunctional properties have been correlated with the control of viral replication in elite controllers [286, 287].

Separately, Flu vaccine failed to show the presence of long-living precursor memory T cells using the PHPC assay. The absence of Flu-specific PHPC does not result from generalized cell death during the 12 days culture, where the viability of cells stimulated with HBV and Flu was high for both on day 12. People exposed to influenza strain in 1918 were refractory to similar H1N1 “swine flu” strain during 2009 epidemic. Seasonal influenza infections requiring annual vaccinations indicate that both virus infections and vaccine immunization are not eliciting long lasting memory responses against conserved antigenic epitopes. Whether recurrent seasonal infections and the reinfections due to strain’s variations are affecting the process of generation of PHPCs remain to be determined. Certain studies on Influenza A viruses (IAV) showed activation and trafficking of bystander T cells into the airways [288]. Bystander activation of T cells is a receptor-independent but a cytokine-dependent phenomenon, where T cells lack specificity for the pathogen [276]. Despite being non-specific for IAV, these memory CD8⁺ T cells express strong cytolytic IL-15 and contribute to protective immunity by secreting cytokines as INF- γ . Infection of naive mice with different strains of influenza resulted in the rapid expansion of memory CD8⁺ T cells independent of antigen stimulation [289]. So far, these bystander T cells were characterized to have significant up-regulation of natural killer group 2D (NKG2D), on the CD44^{Hi}CD8⁺ T cells, but not CD25. Hence, inducing rapid, antigen non-specific memory T cell expansion. Following viral clearance, bystander T cells undergo apoptosis via TRAIL death receptor reducing memory cells with time [290]. Unlike natural infection with influenza virus, infection with *Varicella Zoster virus* in childhood was efficient at inducing PHPCs. With VZV vaccine, previous studies reported by Fourati *et al.* showed that in the overnight ELISPOT assay, the majority of cells producing IFN- γ in response to VZV antigenic stimulation are CD4⁺ rather than CD8⁺ T cells. Aged people were shown to have decreased generation of PHPCs due to increased effector T cell loss following the peak response [291].

Conclusion

Our pilot study demonstrated that the duration of protective T cell immunity against natural infection or vaccination varies widely among the studied infectious diseases. With the PHPC assay developed in our laboratory, we find out that the licensed vaccines, such as PV, HBV and BCG, induce long-lived, highly recallable T cell-based immunity. These historically used vaccines as well as the vaccination scheme were proven to induce long-term immunity following the generation of long-lived memory cells, which constitute a reservoir pool with high recall capacity even after decades. Our PHPC assay was found to be a valuable test that discriminates the vaccines inducing long-term recallable vaccine-

specific T cell immunity (BCG, HBV and PV) from those that fail to elicit this type of protective immunity (Flu). This assay could be generalized to evaluate all existing, but also the newly developed vaccines to evaluate their long-term protective immunity. The results here presented also provide new insights on the initial antigenic imprint on naïve cells and the memorization process that implies differential generation of precursor memory T cells against acute and chronic pathogens. A short-term perspective would consist of a more precise characterization and evaluation of the T cell immune responses pre- and post-vaccination, with current vaccines included in the vaccination chart in many countries. This characterization should be age-dependent and considering the route of vaccine delivery. Multi-parameter analysis in flow cytometry that will help to distinguish the subpopulations involved in these responses, including the detection of specific T_{SCM} as well as the cytokine-secretion capacity, would bring more insight in the characteristics of the long-term protective immunity set up. Focusing on the T_{SCM} identification would reflect their role in their ability to control persistent pathogens.

1. Antia, A., et al., *Heterogeneity and longevity of antibody memory to viruses and vaccines*. PLoS Biol, 2018. **16**(8): p. e2006601.
2. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
3. Wherry, E.J. and R. Ahmed, *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5535-45.
4. Radziewicz, H., et al., *Memory CD8+ T cell differentiation in viral infection: a cell for all seasons*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(36): p. 4848-57.
5. Gattinoni, L., et al., *T memory stem cells in health and disease*. Nat Med, 2017. **23**(1): p. 18-27.
6. Costa Del Amo, P., et al., *Human TSCM cell dynamics in vivo are compatible with long-lived immunological memory and stemness*. PLoS Biol, 2018. **16**(6): p. e2005523.
7. Reiner, S.L. and W.C. Adams, *Lymphocyte fate specification as a deterministic but highly plastic process*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(10): p. 699-704.
8. Nolz, J.C. and J.T. Harty, *Protective capacity of memory CD8+ T cells is dictated by antigen exposure history and nature of the infection*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 781-93.
9. Graef, P., et al., *Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 116-26.
10. Lugli, E., et al., *Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 594-9.
11. Schmueck-Henneresse, M., et al., *Peripheral blood-derived virus-specific memory stem T cells mature to functional effector memory subsets with self-renewal potency*. J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5559-67.
12. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naive-like profile upon yellow fever vaccination*. Sci Transl Med, 2015. **7**(282): p. 282ra48.
13. Li, G., C. Teleki, and T. Wang, *Memory T Cells in Flavivirus Vaccination*. Vaccines (Basel), 2018. **6**(4).
14. Miller, J.D., et al., *Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 710-22.

15. Wahid, R., M.J. Cannon, and M. Chow, *Virus-specific CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell responses and long-term T-cell memory in individuals vaccinated against polio*. J Virol, 2005. **79**(10): p. 5988-95.
16. Cecilia S. Lindestam Arlehamn, A.G., Federico Mele, Ryan Henderson, Justine Swann, Jason A. Greenbaum, Yohan Kim, John Sidney, Eddie A. James, Randy Taplitz, Denise M. McKinney, William W. Kwok, Howard Grey, Federica Sallusto, Bjoern Peters, Alessandro Sette, *Memory T Cells in Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Are Directed against Three Antigenic Islands and Largely Contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 Subset*. PLOS Pathogens, 2013. **9**(1): p. 1-16.
17. Lindestam Arlehamn, C.S., et al., *Memory T cells in latent Mycobacterium tuberculosis infection are directed against three antigenic islands and largely contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 subset*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003130.
18. Axelsson-Robertson, R., et al., *Mycobacterium tuberculosis-specific and MHC class I-restricted CD8+ T-cells exhibit a stem cell precursor-like phenotype in patients with active pulmonary tuberculosis*. Int J Infect Dis, 2015. **32**: p. 13-22.
19. Mpande, C.A.M., et al., *Functional, Antigen-Specific Stem Cell Memory (TSCM) CD4(+) T Cells Are Induced by Human Mycobacterium tuberculosis Infection*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 324.
20. Yuan, J., et al., *A Subset of Mycobacteria-Specific CD4(+) IFN-gamma(+) T Cell Expressing Naive Phenotype Confers Protection against Tuberculosis Infection in the Lung*. J Immunol, 2019. **203**(4): p. 972-980.
21. Cassaniti, I., et al., *Memory T cells specific for HBV enumerated by a peptide-based cultured enzyme-linked immunospot assay in healthy HBV-vaccinated subjects*. Hum Vaccin Immunother, 2016. **12**(11): p. 2927-2933.
22. Sckisel, G.D., et al., *Influenza infection results in local expansion of memory CD8(+) T cells with antigen non-specific phenotype and function*. Clin Exp Immunol, 2014. **175**(1): p. 79-91.
23. Swain, S.L., R.W. Dutton, and D.L. Woodland, *T cell responses to influenza virus infection: effector and memory cells*. Viral Immunol, 2004. **17**(2): p. 197-209.
24. Spitaels, J., K. Roose, and X. Saelens, *Influenza and Memory T Cells: How to Awake the Force*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
25. Calarota, S.A., et al., *HIV-1-specific T cell precursors with high proliferative capacity correlate with low viremia and high CD4 counts in untreated individuals*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5907-15.
26. Ribeiro, S.P., et al., *The CD8(+) memory stem T cell (T(SCM)) subset is associated with improved prognosis in chronic HIV-1 infection*. J Virol, 2014. **88**(23): p. 13836-44.
27. Miller, J.D.e.a., *Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 710-722.
28. Hammarlund, E.e.a., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nat. Med, 2003. **9**: p. 1131-1137.
29. Good, Z., et al., *Proliferation tracing with single-cell mass cytometry optimizes generation of stem cell memory-like T cells*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(3): p. 259-266.
30. Axelsson-Robertson, R., Ju, J.H., Kim, H.Y., Zumla, A. & Maeurer M. *Mycobacterium tuberculosis-specific and MHC class I-restricted CD8+ T-cells exhibit a stem cell precursor-like phenotype in patients with active pulmonary tuberculosis*. Int. J. Infect. Dis. , 2015 **32**: p. 13-22.
31. Yahia Chebloune, M., GéraldineArrode-Brusés, Corinne Ronfort, Deepanwita Bosea, Jean Gagnon, Sanjeev Gumberb, Tara Villinger, Siddappa N.Byrareddy, Pamela A.Kozlowski, Leslie Gosse, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Roger Le Gr and François Villinger, *A single*

- lentivector DNA based immunization contains a late heterologous SIVmac251 mucosal challenge infection.* Vaccine, ELSEVIER, 2020. **38**(21): p. 3729-3739.
32. Sandra A. Calarota, A.F., Renato Maserati, Fausto Baldanti, Stefania Paolucci, Mary A. Young, Christos M. Tsoukas, Julianna Lisziewicz and Franco Lori, *HIV-1-Specific T Cell Precursors with High Proliferative Capacity Correlate with Low Viremia and High CD4 Counts in Untreated Individuals.* The Journal of Immunology, 2008. **180**(9): p. 5907-5915.
 33. Géraldine Arrode-Brusés, M.M., Monique Baccard-Longere, François Villinger, and Yahia Chebloune, *Long-Term Central and Effector SHIV-Specific Memory T Cell Responses Elicited after a Single Immunization with a Novel Lentivector DNA Vaccine.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110883.
 34. Ely, K.H., et al., *Nonspecific recruitment of memory CD8+ T cells to the lung airways during respiratory virus infections.* J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1423-9.
 35. Bonnie van Wilgenburg, L.L., Zhenjun Chen, Troi J. Pediongco, Huimeng Wang, Mai Shi, Zhe Zhao, Marios Koutsakos, Simone Nüssing, Sneha Sant, Zhongfang Wang, Criselle D'Souza, Xiaoxiao Jia, Catarina F. Almeida, Lyudmila Kostenko, Sidonia B. G. Eckle, Bronwyn S. Meehan, Axel Kallies, Dale I. Godfrey, Patrick C. Reading, Alexandra J. Corbett, James McCluskey, Paul Klenerman, Katherine Kedzierska & Timothy S. C. Hinks *MAIT cells contribute to protection against lethal influenza infection in vivo.* Nat. Commun., 2018. **9**: p. 4706.
 36. Talyn Chu, A.J.T., Sarah Roepke, Amy M Berkley, Amanda Woodward-Davis, Laura Pattacini, Michael J Bevan, Dietmar Zehn, Martin Prlic, *Bystander-activated memory CD8+ T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner.* Cell Rep, 2013. **3**: p. 701-708.
 37. Li, M., et al., *Age related human T cell subset evolution and senescence.* Immun Ageing, 2019. **16**: p. 24.

Conclusion générale et perspectives

La pandémie de HIV-1/SIDA reste toujours un problème majeur de santé publique malgré près de 40 ans de travaux sur la biologie du virus, la pathogénèse induite et le développement de vaccins. En 2020, 1,5 millions de personnes ont été nouvellement infectées par HIV-1 et 680 000 sont mortes des causes de l'infection. Aucun traitement ne permet de guérir l'infection, et bien que d'énormes avancées aient été faites avec la multithérapie, permettant d'allonger considérablement la durée et la qualité de vie des patients, ce traitement reste lourd et très coûteux. Également, le risque de développer des variants résistants est à prendre en considération. Les propriétés d'intégration du génome viral ainsi que la latence, la variabilité des souches et le tropisme du virus pour les cellules du système immunitaire rendent son éradication fortement difficile. Ces propriétés sont aussi responsables de l'échec thérapeutique. Le développement d'un vaccin représente la meilleure solution face à cette impasse.

De nombreuses stratégies vaccinales ont vues le jour, mais aucune d'entre elles n'a pu associer sécurité et efficacité de protection chez l'homme. Une stratégie vaccinale innovante est absolument nécessaire pour espérer développer des prototypes qui mettent fin à cette épidémie.

Les prototypes vaccins que nous avons développés associent les propriétés des virus répliquatifs et de l'ADN déficient sans leurs inconvénients. Ces prototypes lentiADN effectuent un cycle de réplication rétroviral pour amplifier l'Ag mais sans intégrer le génome vaccinal dans celui de la cellule hôte. Cette innovation associe les stratégies prime/boost après une seule immunisation. Nos travaux ont clairement démontré une augmentation substantielle d'antigénicité des prototypes. Également, les réponses immunes induites persistent pour de longues durées associées à la mise en place de cellules immunitaires mémoires. Ces réponses sont aussi associées à la protection de tous les animaux vaccinés contre l'infection par des virus pathogéniques. Cette protection est associée au développement de cellules précurseur PHPC, avec une capacité de prolifération élevée et d'auto-renouvellement, qui pourrait permettre de régénérer le pool de cellules mémoires spécifiques du HIV-1 après différenciation.

Il est établi que la présence des cytokines joue un rôle dans l'immunité, et particulièrement les cytokines IL-7 et IL-15 qui ont connu un gain d'intérêt ces dernières années pour leur action sur la génération de cellules mémoires, l'amélioration de la survie et la prolifération des cellules T.

L'hypothèse de ce travail était de déterminer si l'expression concomitante des cytokines IL-7 et IL-15 dans la même fenêtre de temps que les antigènes viraux permettrait de potentialiser le pool de ces cellules T précurseurs mémoires spécifiques des antigènes vaccinaux.

Ce travail a montré que :

- La transfection des lentiADN adjuvantés ou non des cytokines *in cellulo* a montré la production et la sécrétion de la protéine virale SIV Gag p27 ainsi que des cytokines, avec un pic entre le jour 2 et 3 post-transfection.
- La production concomitante des antigènes et des cytokines permettait d'induire une réponse cellulaire spécifique accrue.
- La fonctionnalité de ces cytokines sécrétées a pu être confirmée grâce au test PHPC, montrant la survie et différenciation des cellules après 12 jours. Le nombre de cellules effectrices provenant de la différenciation des PHPC était plus faible lorsque celles-ci étaient en contact avec les cytokines produites par les lentiADN comparées aux cytokines commerciales à concentration égales mais ce résultat peut être expliqué par un degré de purification différent.
- Chez la souris, les résultats ont montré une augmentation considérable des cellules T spécifiques de Gag qui sécrètent l'IFN- γ et l'IL-2 à 8 et 10 semaines post-immunisation, montrant le renforcement de leurs propriétés multifonctionnelles par les cytokines sur le long terme.
- Chez les macaques, les résultats ont montrés i) une augmentation des réponses T CD8 multifonctionnelles spécifiques de Gag, avec la production d'IFN- γ , Granzyme B et MIP-1 β ; ii) la présence de cellules T CD4 mémoires centrales ; et iii) une réponse humorale spécifique dirigée contre Env. La réponse humorale contient des IgG qui possèdent une activité ADCC, connue pour jouer un rôle dans le contrôle de l'infection par HIV-1. Enfin, iv) une augmentation des IgA dans les sécrétions rectales.

Ces résultats démontrent que l'adjuvantation d'un vecteur lentiADN par les cytokines entraîne la production de cellules précurseur-mémoires PHPC. Ce phénotype particulier pourrait permettre le renouvellement du pool de cellules mémoires et ainsi permettre le contrôle à long terme du HIV-1.

Afin de déterminer si les réponses immunitaires spécifiques mises en place après vaccination sont capables de contrôler l'infection par le virus et éventuellement caractériser la protection et sa durée, il aurait été intéressant d'infecter les macaques par une souche SHIV pathogénique. Une infection répétée et à faible dose par voie intrarectale aurait permis à la fois de mimer un mode d'infection fréquent, mais également d'apprécier les paramètres de protection.

Des travaux récents ont montré que la co-expression de l'IL-15 avec son récepteur IL-15R α permettait d'améliorer la stabilité, la demi-vie et la fonctionnalité de la cytokine puisqu'elle est communément *trans*-présentée à l'état physiologique [292]. Cette combinaison pourrait augmenter d'avantage le maintien des cellules mémoires spécifiques des antigènes induite par le lentiADN. Cette combinaison a déjà été étudiée pour le traitement de certains cancers.

Il paraît tout à fait envisageable de poursuivre l'étude de ce prototype lentivecteur ADN chez l'homme : en effet, bien que les vaccins ADN aient plutôt été utilisés en médecine vétérinaire, l'urgence liée à la pandémie de SARS-CoV-2 a permis la mise en évidence de l'innocuité et de l'efficacité d'un vaccin ADN [188]. Egalement, une récente étude testant la tolérance de l'électroporation d'un vaccin ADN contre le HIV-1 a pu montrer son aspect sécuritaire, ainsi que la tolérabilité de cette méthode sur un groupe de volontaire, la jugeant acceptable par la plupart des participants [199].

Cette preuve de concept pourra mener à l'adaptation de ce prototype vaccin en l'adaptant à d'autres maladies infectieuses. En effet, il serait aisé, rapide et peu coûteux de remplacer les gènes codant pour les protéines virales du HIV-1 et de les remplacer par les gènes du pathogène d'intérêt par des techniques de biologie moléculaire, tout en gardant les caractéristiques innovantes de base de notre vaccin prototype.

L'importance des cellules mémoires, et principalement des PHPC, dans le contrôle persistant de l'infection par HIV-1 nous a amené à vouloir évaluer ces réponses dans d'autres pathologies infectieuses récurrentes. Nous avons émis l'hypothèse que la présence de PHPC qui prolifèrent

vigoureusement et produisent des cytokines en réponse à la restimulation tardive de l'antigène pourrait être corrélée à une protection à long terme.

Nous avons mesuré les taux de lymphocytes T à mémoire effectrice immédiate et les PHPC circulants humains spécifiques du virus varicelle-zona (VZV), de la grippe (Flu) et du poliovirus (PV) comme modèles d'infections aiguës ; tandis que les antigènes du virus de l'hépatite B (VHB) et de *Mycobacterium tuberculosis* (Tb) ont été utilisés comme modèles d'infection chronique. Pour mimer ces antigènes, nous avons utilisé des vaccins licenciés du commerce.

Nous avons pu détecter la persistance des lymphocytes T à mémoire effectrice remobilisables des décennies après la vaccination/l'infection contre tous les antigènes testés. Non seulement les vaccins contre le VHB, BCG et PV, mais aussi l'infection naturelle par le VZV ont induit un pool de cellules T mémoire à longue durée de vie (PHPC) qui se différencie *ex vivo* en T_{CM} et T_{EM} après l'exposition à l'antigène, offrant une protection à long terme. Au contraire, l'antigène de grippe et les cytokines homéostatiques n'ont pas réussi à induire des PHPC mesurables spécifiques de l'antigène. Etant donné les résultats obtenus après stimulation par l'antigène grippal, il serait intéressant de voir l'effet d'une co-stimulation HBV-Flu. Une diminution du nombre de PHPC indiquerait peut-être un effet des antigènes Flu sur la production et/ou la durée de vie des PHPC, et pourrait ouvrir à des investigations plus poussées pour comprendre le mécanisme impliqué. Ces résultats peuvent néanmoins questionner sur l'efficacité du vaccin antigrippal actuel, et pousser vers l'arrêt de la production d'un vaccin saisonnier, pour la production d'un vaccin induisant des cellules T mémoires spécifiques à longue durée de vie.

Nos données fournissent la démonstration de la persistance à long terme des réponses des lymphocytes T facilement remobilisables après plusieurs décennies post-immunisation, près de 60 ans contre le BCG et PV, et près de 25 ans pour le VHB pour un donneur immunisé. Cette étude préliminaire pourra être élargie en utilisant une cohorte plus importante de volontaires afin de confirmer ou non les résultats obtenus, et également sur un nombre de pathologies infectieuses plus élevé.

Bien que les réponses T effectrices et humorales neutralisantes ont un rôle déterminant dans le contrôle des maladies infectieuses aiguës, notre étude pilote montre que les réponses cellulaires

T mémoires et leurs précurseurs sont déterminantes pour le contrôle à long terme des pathologies infectieuses chroniques ou persistantes.

Il semblerait intéressant de voir si ces résultats peuvent être extrapolés à des patients infectés par HIV-1. Ainsi, nous pourrions évaluer si, lors d'un traitement HAART, ces patients développent des PHPC spécifiques du virus. Grâce à ce test, il serait possible de caractériser après combien de temps ces PHPC sont mis en place, ainsi que leur durée d'action. Ces réponses seraient essentielles pour envisager un arrêt du traitement HAART, si le taux de PHPC spécifiques est suffisamment élevé pour contrôler le virus, et pourrait ouvrir la porte à de nouvelles stratégies dans le traitement contre HIV-1, soulageant les patients des lourds effets accompagnants la thérapie antirétrovirale.

D'une autre manière, et en réponse à la crise sanitaire due au SARS-CoV-2, il serait intéressant d'utiliser ce nouvel outil pour évaluer la présence de ces PHPC spécifiques chez des patients convalescents ayant eu différents degrés de sévérité de la maladie. Ainsi, il pourrait être intéressant de déterminer le rôle des PHPC dans cette pathologie, et si leur présence pourrait être corrélée ou non à l'évolution favorable de la maladie. Egalement, l'évaluation des réponses PHPC mises en place après vaccination pourrait renseigner sur le besoin ou non de rappel immunologique.

Plus largement, le test PHPC pourrait être inclus pour l'évaluation des vaccins anciennement et nouvellement licenciés. De par sa facilité de mise en place, il pourrait aussi être aisément automatisable, accessible et peu coûteux. L'évaluation utilisant le test PHPC semble donc un outil précieux pour la mesure de ces réponses.

Annexes

Matériel et méthodes

Matériel & méthodes

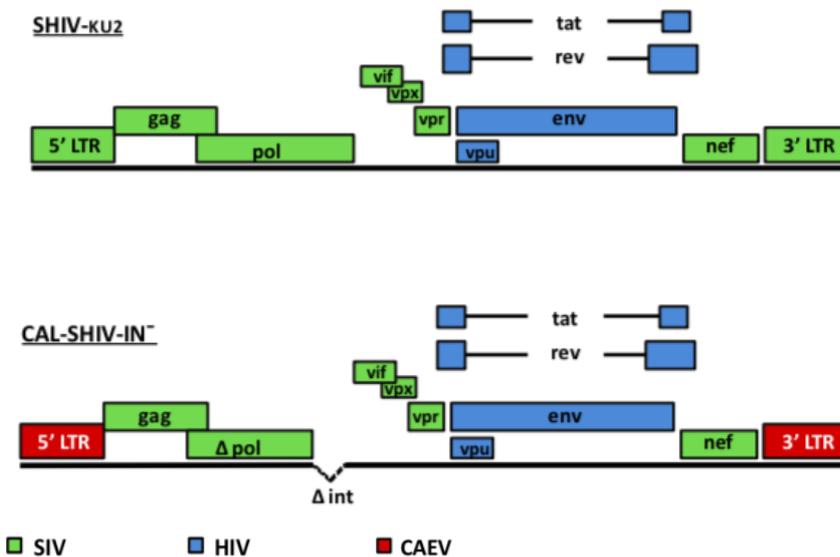
Projet 1 :

I- Obtention des vecteurs vaccinaux

1) Vecteurs disponibles

La construction du plasmide CAL-SHIV-IN⁻ contenu dans des bactéries *E.coli* K12 (JM 109, Promega) ont été utilisés

Le génome du vecteur CAL-SHIV-IN⁻ est basé sur celui du virus pathogénique SHIV-KU2. Il a été cloné dans le plasmide pET9 (Novagen, EMD chemicals, San Diego, CA) et comporte tous les gènes de ce virus à l'exception de l'intégrase, qui a été délété par digestion enzymatique. Les LTR 5'et 3' du SIV ont été remplacées par celles du lentivirus caprin CAEV (Caprine Arthritis Encephalitis Virus) qui possède un promoteur constitutif indépendant de la transactivation par Tat. Notre vecteur CAL-SHIV-IN⁻ exprime donc les gènes gag, pol (Δint), vif, vpx, vpr et nef du SIVmac239 (GenBank # M33262) ainsi que vpu, tat, rev et env du VIH-1 SF2 (GenBank # K02007) sous le contrôle des LTRs du CAEV.



2) Constructions des vecteurs CAL-SHIV-IN IRES rmIL-7 / CAL-SHIV-IN IRES rmIL-15

Le premier objectif a été de créer la cassette IRES + Cytokine. Pour ce faire, le plasmide commercial pGEM-T easy (Promega) a été utilisé pour le clonage de produits de PCR. Les

plasmides pNDgmsrRM-IL-7 et pNDgmsrRM-IL15 ont été fournis par le professeur François Villinger, New Iberia Research Center, Louisiane (Etats Unis).

L'amplification initiale de la séquence des cytokines a été réalisée par PCR avec l'ADN Taq polymérase (Euromedex) tandis que le criblage de l'ADN transformé a été réalisé en utilisant l'EconoTaq Plus Green 2X Master Mix (Lucigen), selon les instructions du fabricant.

Toutes les amplifications ont été effectuées comme suit :

- 2 min à 95°C

24 cycles comprenant successivement

* *Dénaturation* : 20 sec à 95°C,

* *Hybridation des amorces* : 30 sec à 62°C,

* *Elongation* : 35 sec à 68°C ;

- Elongation finale : 2 min à 68°C

Cible	Amorce sens	Amorce antisens
rmIL-7	5'GATTTAAATGGATCCATGTGGCTG CAAGGCCTGCTGCTCTT'3	5'GCGTCGACCGGTAATTGCAATCAAGA AGTGTTGATGAACA-3'
rmIL-15	5'GATTTAAATGGATCCATGTGGCTG CAAGGCCTGCTGCTCTT'3	5'GCGTCGACCGGTAATTGCAATCAAGA AGTGTTGATGAACA-3'
T7 promoter	/	5'TGTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'
SP6 promoter	5'-GCTATTTAGGTGACACT ATAGA-3'	/
IRES	5'-ACCGGTGTGAATGCA TTAGGCGTACGTCTCC-3'	/

Digestion enzymatique

Les digestions enzymatiques ont été effectuées en utilisant 10 U d'enzyme de restriction par µg d'ADN dans le tampon approprié spécifié par le fabricant. (New England Biolabs, Fermentas, Takara).

Autres réactions enzymatiques

La phosphatase alcaline de veau (CIP ; New England Biolabs) a été utilisée pour la déphosphorylation des fragments d'ADN digérés.

La T4 DNA ligase (Takara) a été utilisé pour la ligation des vecteurs et des inserts. Un ratio de 1 : 4 a été appliqué, respectivement. Ces enzymes ont été utilisées selon les instructions de chaque fabricant.

Electrophorèse en gel d'agarose :

Un mélange de poudre d'agarose (Roth) et une solution de TAE 1X ont permis d'obtenir un gel dont la concentration varie de 0,7 à 1,5% selon la taille prédite des fragments d'ADN. L'ADN a été mélangé à un tampon de charge (Purple loading dye 6X, New England Biolabs) puis déposée sur gel en parallèle d'un marqueur de taille d'ADN de 1 kb (Euromedex). Une tension de 25 V pendant 10 min a premièrement été appliqué afin de faire migrer correctement l'ADN hors des puits du gel, puis à 100 V pendant 40 min dans du tampon TAE

1X. Après 30 min de coloration au bromure d'éthidium (Euromedex), les gels ont été visualisés grâce au lecteur Gel Doc XR + (Bio-Rad) et les enregistrements photographiques ont été acquis par le logiciel Image Lab (Bio-Rad).

Transformation bactérienne

Les plasmides recombinants ont premièrement été transformés en bactérie *E. coli* JM109 compétente (Promega, France). Cinq microlitres de produit de ligation ont été ajoutés à 50 µL de bactéries compétentes, puis incubés dans de la glace pendant 20 min. Un choc thermique bref de 45 sec à 42 °C a été appliqué puis le tube a été immédiatement refroidi dans la glace pendant 5 min. Les bactéries ont ensuite été incubées 2 h à 37 °C, 200 rpm dans 500 µL de milieu SOB (2% de bacto-tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂). Les bactéries ont ensuite été étalées sur deux géloses LB-agar (avec 50 et 450 µL de suspension bactérienne chacune) supplémentées avec l'antibiotique approprié. Si nécessaire, le substrat Xgal - IPTG (40 µg/mL – 10 µg/mL) a été ajouté, permettant de sélectionner les clones correctement transformés par screening des colonies bleues/blanches.

Les géloses ont été incubées à 32°C pendant une nuit et les colonies isolées ont été stérilement prélevées et transférées dans 5mL de milieu LB Lennox (Roth) additionné de 100 mg/µL d'ampicilline ou de 50 mg/µL de kanamycine, et cultivées individuellement entre 18 et 20h sous agitation à 150 rpm.

Dans un second temps, les plasmides finaux ont été transformés en bactéries *E. coli* Stbl3 One Shot (Invitrogen) développées pour assurer plus de stabilité et un meilleur rendement lors de l'amplification de vecteurs lentiviraux contenant des LTRs. Ces bactéries ont été cultivées à 30°C, 150 rpm.

Amplification et extraction des ADN plasmidiques

Les clones des bactéries contenant les plasmides CAL-SHIV-IN⁻, CAL-SHIV-IN⁻IRES rmlL-7 et CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-15 ont été isolées sur géloses LB/kanamycine et incubés une nuit à 30°C. Après 8h de culture, 1.5 mL de suspension bactérienne a été utilisé pour une extraction rapide de l'ADN à l'aide du kit Miniprep Nucleospin Plasmid Easy Pure (Macherey-Nagel), digéré par enzymes de restriction et séparé sur gel d'agarose 1% afin de vérifier la qualité et le profil du plasmide. Une fraction de cet ADN a été utilisé pour séquençage.

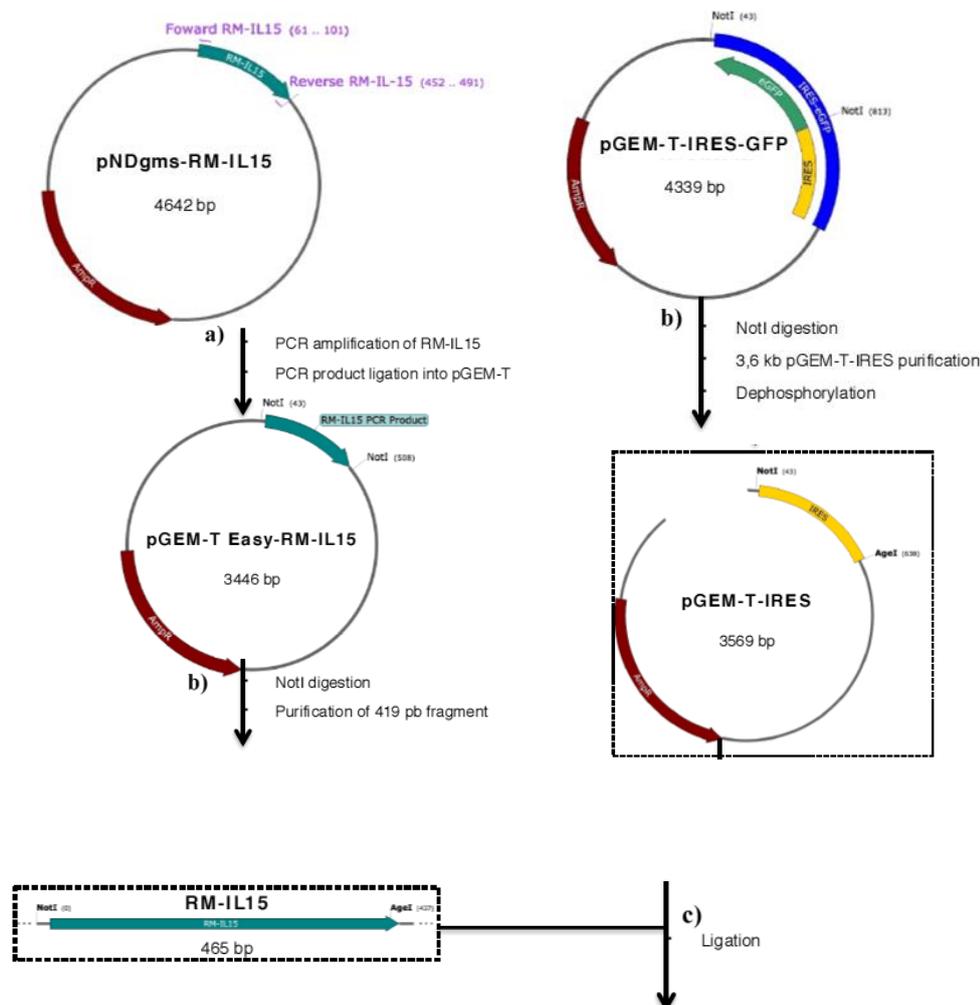
Les bactéries contenant les plasmides jugés satisfaisant ont été utilisées pour ensemercer 50 mL de chaque construction dans du LB kanamycine, cultivés à 30°C, 150 rpm pendant 20h. Ces cultures ont été mélangées à 50 mL d'une solution stérile de glycérol 60% (v/v), puis aliquotées et été placés à -80°C. Les aliquots ont été utilisés à usage unique pour chaque culture afin d'éviter les variations génétiques et les mutations entre les différentes extractions. Pour ce faire, les bactéries ont été lentement décongelées dans de la glace, puis précautionneusement versés dans une fiole à ailette de 2L contenant 500 mL de milieu LB / kanamycine.

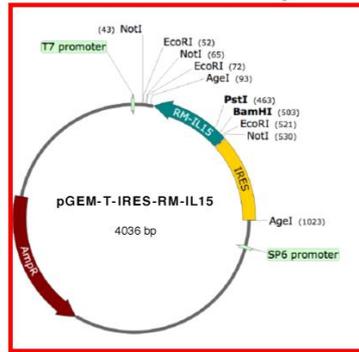
Après 20h de cultures dans les mêmes conditions que décrites précédemment, l'ADN a été extrait par le kit Maxirep endotoxin-free (NucleoBond Xtra Maxi EF Macherey-Nagel), conformément aux instructions du fabricant.

Le culot d'ADN ainsi récupéré a été dissout dans de l'eau stérile endotoxine- / nucléase-free et la concentration a été déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260nm (BioSpectrometer, Eppendorf) La pureté a également été vérifiée par le rapport des longueurs d'onde 230 nm/260 nm et 280 nm/260nm.

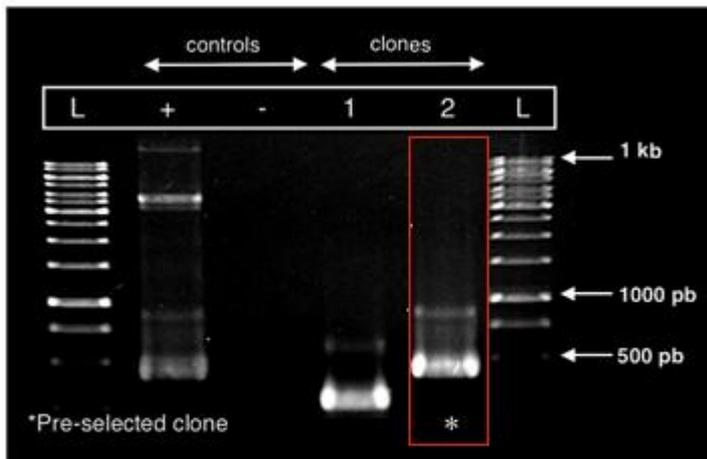
Gel extraction d'ADN

Afin d'extraire la partie de notre ADN d'intérêt après restriction enzymatique, le produit de digestion a été déposé sur gel d'agarose a la concentration désirée, contenant du SYBR Safe (Invitrogen), et migré à 70 V pendant 1h pour une résolution suffisante. Le gel contenant le fragment d'ADN relargué a pu être identifié sous lumière bleue (afin d'éviter la dégradation de l'ADN par les UV) grâce à un filtre orange, puis découpé et pesé. Le kit PCR Cleanup (Promega #A9282) a été utilisé selon le protocole décrit par le fabricant.

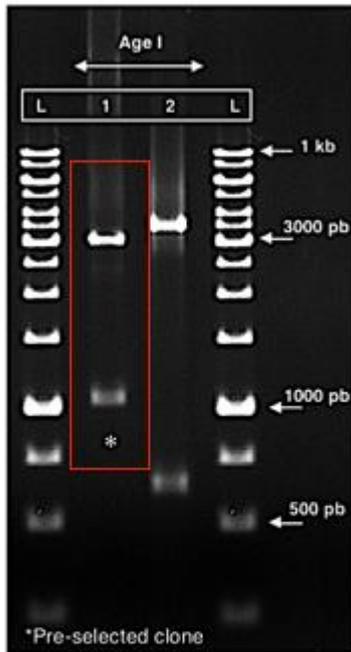




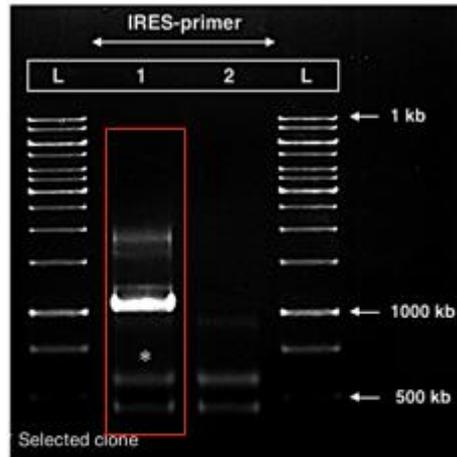
Vecteur Intermédiaire



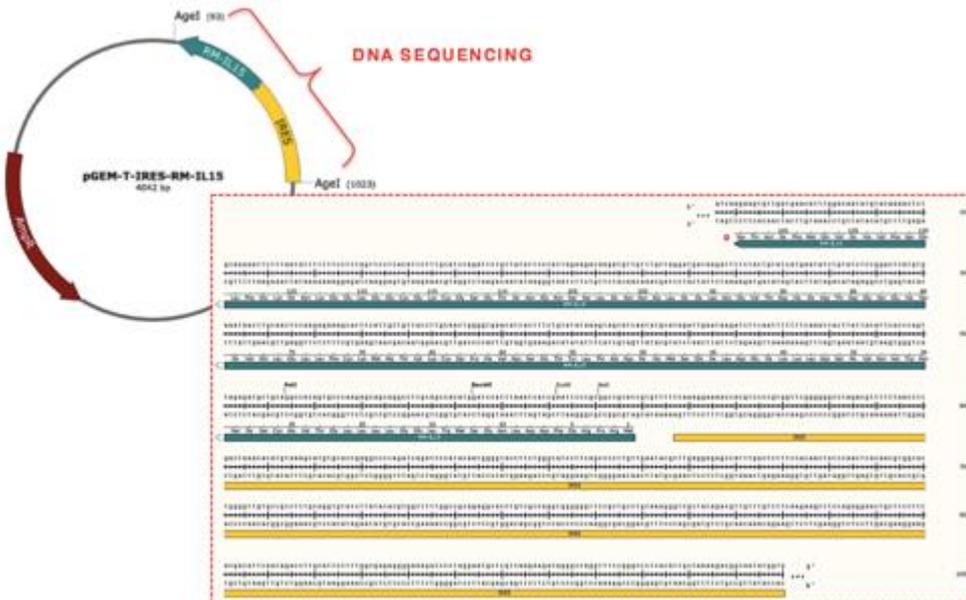
Electrophoresis on 1,5% agarose gel PCR amplification product among recombinant clones obtained by Ampicillin selection.



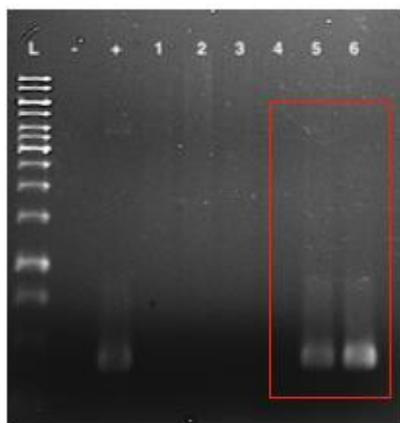
Agel enzymatic digestion profile of two representative selected by PCR



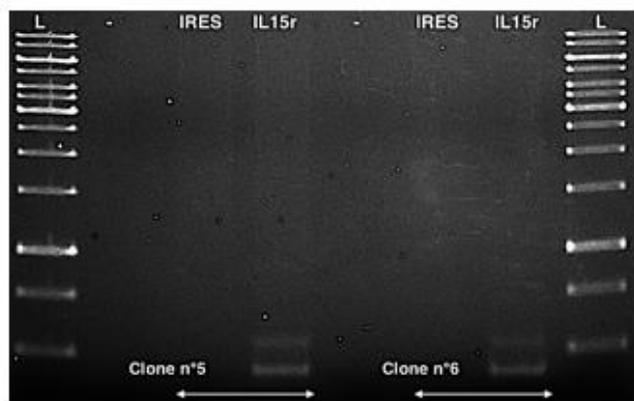
Electrophoresis on 1,5% agarose gel PCR amplification of IRES-IL15 cassette



1) Cytokine containing recombinant clones 2) Cytokine correct orientation



Electrophoresis on 1,5% agarose gel PCR amplification of IL15



Electrophoresis on 1,5% agarose gel PCR amplification of IRES-IL15 cassette

II. Etudes *in cellulo*

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires HEK 293TT et Lenti-X 293T issues de cellules épithéliales de rein embryonnaire humain ont été maintenues dans du DMEM (Dulbecco's modified eagle medium , Corning #10-013CV) et utilisées pour la transfection, et des lignées lymphocytaires humaines CEM-x-174, et M8166 pour l'étude des effets cytopathiques et maintenues dans du RPMI 1640 (Corning, 10-040 CV). Les cellules TZM-bl dans du DMEM ont été utilisées pour les tests de neutralisation. Les cellules CEM.NKr-CCR5 CD4+ T et KHYG-1 NK maintenues dans du RPMI 1640 ont servis aux tests ADCC.

Ces lignées ont été obtenues du NIH (AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH). Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂, sous atmosphère humide.

Les milieux de culture appropriés ont été supplémentés avec 10% de Sérum bovin foetal (VWR, 35-011-CV) décomplémenté à 56°C pendant 30 min; et de la pénicilline et streptomycine (Corning #30-003CI) à une concentration finale de 0.05 U/mL et 0.05 µg/mL, respectivement.

Transfection transitoire des cellules HEK 293T par le phosphate de calcium

Cette méthode est particulièrement employée pour la transfection des cellules HEK 293T. La solution de phosphate de calcium est facilement réalisable en laboratoire, et est également très peu onéreuse. Des cellules adhérentes HEK 293T ont préalablement été cultivées en plaque 6 puits (Costar #3516). Une fois la monocouche de cellule ayant atteint 60 à 80% de confluence, celles-ci ont été transfectées.

Une solution saline tamponnée par du HEPES deux fois concentrée (HEPES-buffered saline solution – 2X HBSS) contenant des ions phosphate a été mélangée avec une solution de chlorure de calcium contenant l'ADN à transférer.

Un précipité de phosphate de calcium se forme après mélange des deux solutions, liant l'ADN à transférer à sa surface. La suspension contenant le précipité a été ajoutée aux cellules à transférer. Les ions Ca^{2+} masquent la polarité négative de l'ADN, permettant son entrée dans la cellule.

La qualité et la pureté de l'ADN a préalablement été vérifié sur gel d'agarose et par spectrophotométrie. Les ADN transfectés reflétaient tous une pureté supérieure à 1.8 pour le ratio 260/280 nm, et compris entre 1.8 et 2.2 pour le ratio 260/230 nm. Également, tous les plasmides étaient représentés à hauteur de 90% sous la forme topologique super-enroulé.

Une quantité de 5 μg d'ADN a été diluée dans 250 μL d'une solution de CaCl_2 , puis brièvement vortexée. Le mix a ensuite été délicatement déposé goutte à goutte dans 150 μL de 2X HBSS puis incubé 30 min à température ambiante avant d'être déposé goutte à goutte sur les cellules. La réaction a été ainsi incubée pendant 8h avant d'éliminer le surnageant.

CaCl_2 , 2.5 M

183.7 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

H_2O jusqu'à 500 mL

Stériliser à l'aide d'un filtre nitrocellulose 0.45 μm et conserver à -20°C en aliquots

HEPES-buffered saline (HeBS) solution, 2×

16.4 g NaCl (0.28 M final)

11.9 g HEPES (0.05 M final)

0.21 g Na_2HPO_4 (1.5 mM final)

800 ml H_2O

Titrer le pH à 7.05 par ajout de 5 N NaOH

Compléter à 1L avec H_2O

Stériliser à l'aide d'un filtre nitrocellulose 0.45 μm et conserver à -20°C en aliquots

Dans chacune de ces expériences, des cellules non-transfectées ont été utilisées comme contrôles négatifs, alors que d'autres cellules transfectées par le plasmide exprimant la GFP (CAL-SHIV-IN⁻ IRES GFP) constituent des contrôles positifs permettant d'estimer l'efficacité de transfection après observation au microscope à épifluorescence.

1) Etude de l'expression des antigènes des lentivecteurs

Coculture des cellules HEK 293T transfectées et des cellules des lignées lymphocytaires M8166

Le surnageant de cellules HEK-293T ensemencées dans des plaques 6 puits (Costar #3516) est prélevé (jour 0), puis les cellules sont respectivement transfectées avec les plasmides CAL-SHIV-IN⁺ selon le protocole précédemment décrit. Le lendemain, le milieu de culture est changé puis remplacé avec 1 mL de milieu frais. Ensuite, les surnageants de transfection contenant les particules virales ainsi que ceux des cellules contrôles non-transfectées sont récoltés à 24 h (jour 1), puis 10^6 cellules M8166 sont co-cultivées dans chacun des puits avec les monocouches de HEK 293T. Chaque jour les surnageants sont récoltés, centrifugés rapidement pour précipiter les cellules M8166 en suspension et stockés à -80°C . Les cellules M8166 sont ensuite resuspendues dans 500 μL de RPMI 10% SVF et ajoutées dans leurs puits d'origine avec les HEK 293T supplémentées par 500 μL de DMEM 10% SVF. Les surnageants sont ainsi collectés pendant 5 jours consécutifs post transfection. Les échantillons sont utilisés pour déterminer la cinétique de production de SIV Gag p27 par test ELISA.

Quantification de la protéine p27 par test ELISA

Afin de connaître la cinétique d'expression de la protéine Gag, les surnageants ont été collectés à partir des cultures de cellules HEK 293T à 1, 2, 3 et 5 jours post-transfection.

Les échantillons ont été centrifugés afin d'éliminer les débris de cellules résiduels et congelés à -80°C .

Les échantillons ont été évalués par le kit commercial d'ELISA p27 (ABL, cat #5450) en respectant les instructions du kit.

Un volume de 25 μL de tampon de lyse a d'abord été distribué dans les puits d'une plaque prétraitée avec un anticorps souris anti-p27. Ensuite, 100 μL de chaque échantillon ont été distribués puis la plaque a été incubée pendant 1 h à 37°C . Également, pour permettre de déterminer un rapport entre la concentration de la protéine et la densité optique (DO) obtenue, une dilution en série de la protéine p27 fournie avec le kit a été réalisée afin de permettre le tracé d'une courbe étalon.

Une étape de lavage a été opérée avec 4 fois 300 μL de tampon de lavage, puis vidée par retournement et égouttée sur du papier absorbant par de légers tapotements. 100 μL d'anticorps de détection anti-p27 couplée à la peroxydase ont été ajoutés dans chaque puits et incubé 1 h à 37°C . Une étape de lavage a ensuite été rapidement suivie de l'ajout du substrat tetraméthylbenzidine (TMB) dans chaque puits, et incubée à température ambiante pendant 30 min en absence de lumière. La réaction est enfin arrêtée en ajoutant 100 μL de H_2SO_4 2N. Les DO ont été déterminées dans les minutes suivantes, à une longueur d'onde de 450 nm. Les concentrations de p27 dans nos échantillons sont déterminées à l'aide de la droite d'étalon et exprimées en ng/mL. Ce test a été utilisé pour comparer la production de p27 à partir des cellules transfectées par nos différents vecteurs CAL-SHIV-IN⁺ avec/sans cytokines.

Stimulation avec les peptides du SHIV

Les peptides antigéniques utilisés proviennent du National Institute of Health (NIH). Il ont été fournis sous forme de peptides lyophilisés de 15 acides aminés (a.a) présentant des régions chevauchantes de 11 a.a, couvrant l'ensemble de chacune des protéines Gag et Nef du SIV ainsi que Env (C terminal), du VIH-1 clade B (catalogue nos. 6204, 6451, et respectivement).

III. Etudes *in vivo*

Les études sur animaux ont été faites en accord avec le IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) – IACUC number approval 2019-8743-030, et selon les règles pour le respect de l'éthique animale.

1. Caractérisation des réponses immunes après vaccination de modèle murin : souris BALB/cJ

Immunsation des souris

8 couples de souris BALB/cJ âgées de 4-6 semaines ont été fournies par Jackson Laboratory pour reproduction. Après réception, une période minimale d'une semaine a été respectée afin d'acclimater des souris à leur nouvel environnement.

Les souriceaux obtenus ont été sevrés après une période de 21 jours comme recommandé pour cette lignée.

Les groupes ont été formés avec les souriceaux mâles et femelles (en proportion similaires) âgés de 4-6 semaines, et organisés comme suit :

- Groupe 1 : 20 souris immunisées avec CAL-SHIV-IN⁻
- Groupe 2 : 20 souris co-immunisées avec CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-7 et CAL-SHIV-IN⁻ IRES IL-15

Les souris ont été séditées à l'aide de vapeur d'isoflurane (Patterson Veterinary). Dans une enceinte fermée, quelques gouttes d'isoflurane ont été déposées sur une compresse de gaze. Après 30 secondes à 1 minute, les animaux tranquilisés ont été immunisés.

La procédure a été effectuée à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille hypodermique (25G). Un total de 100 µg d'ADN dilué dans du PBS (Hyclone, 35-001 CV) à une concentration finale de 1mg/mL, a été injecté. L'administration a été répartie en deux voies d'administration : 50 µL en intradermal (ID) – sur le haut du dos ; et 50 µL en intramusculaire (IM) – dans le muscle de la cuisse droite.

Pour le groupe co-immunisé, les deux plasmides ont préalablement été mélangés, soit 0.5 mg de chaque plasmide pour un total de 1 mg/mL final.

L'injection intradermale a été immédiatement (< 30 secondes) suivie d'une électroporation. (Générateur : CUY21 edit II electroporator, BEX CO, LTD. Japan – Electrodes pour l'électroporation *in vivo* : tweezer with fork and platinum rectangular electrode : model no LF663P5X5). L'impédance entre les électrodes et la peau de la souris a été vérifiée

automatiquement avant chaque électroporation. L'appareil a été paramétré pour délivrer les paramètres suivants :

Courant constant (Square wave) :

- 1 pulse permettant de créer des pores dans la membrane des cellules (Poration pulse Pp) – 700V/cm pendant 10 msec.
- 5 pulses permettant à l'ADN d'entrer dans la cellule (Driving pulse Pd) – 100V/cm pendant 10 msec, espacés de 50msec. Une limite de 300mA maximum est délivré (PdA)

L'espace entre les électrodes a été mesuré et fixé à 0.2 cm. L'appareil a donc été programmé pour Pp=140 V et Pd=20V.

Afin d'assurer un meilleur contact avec la peau de l'animal, les poils ont été préalablement tondu et du gel conducteur pour électrode (SignaGel, Parker) a été appliqué sur la peau de l'animal.

Lors de chaque échéance, soit 2, 4, 8 ou 10 semaines post-vaccination, 5 souris par groupes ont été euthanasiées pour l'analyse des réponses immunes.

Les souris ont été sédaturées par vapeur d'isoflurane pendant la totalité de l'opération. Dans un premier temps, une ponction intracardiaque a été effectuée afin d'analyser le taux d'anticorps sériques spécifiques des antigènes vaccinaux. Stérilement, l'animal a été placé en décubitus dorsal, puis la cavité abdominale a été incisée du bas du sternum jusqu'en haut de la cage thoracique à l'aide de ciseaux chirurgicaux. L'apex du cœur a été dégagé et une aiguille 23G montée sur une seringue de 1 mL a été utilisée pour prélever le sang. Une moyenne de 0.7 mL de sang a été collectée pour chaque souris, et disposée en tubes secs le temps de la coagulation. Enfin dans un deuxième temps, la rate de l'animal a été prélevée stérilement et recueillie dans un tube contenant 5 mL de RPMI complet, dans de la glace.

Traitement des échantillons biologiques

Sérum : Après coagulation en position verticale à température ambiante, le tube a été centrifugé 10 min à 2000g afin d'isoler le sérum du caillot. Le sérum a été aliquoté puis placé à -80°C.

Rate : Les rates ont été placées entre deux lames en verre stériles avec du milieu RPMI complet et dilacérées avec précaution afin d'en isoler les splénocytes. La suspension recueillie a été traitée avec une solution de lyse Ammonium-Chloride-Potassium (ACK lysing buffer, Quality Biological Inc.) afin d'éliminer les hématies. Après lavage et centrifugation, les cellules vivantes ont été comptées sur hémocytomètre après coloration au Bleu trypan. Les splénocytes ont été utilisés pour analyses en cytométrie en flux après stimulation avec des pools de peptides SIV Gag, HIV Env (C terminal), SIV Nef décrits plus haut et marquages extra- et intra-cellulaires.

Tests immunologiques pour évaluation de l'immunogénicité des prototypes vaccinaux

a. Etude du phénotype et de la sécrétion de cytokines en présence d'antigènes dans les splénocytes de souris vaccinées

Après extraction, 1.10^6 splénocytes ont été stimulés pendant 6 heures avec les peptides Gag, Env ou Nef, puis ont été marqués par un panel d'anticorps afin de mettre en évidence le phénotype des cellules. Après perméabilisation, un second panel pour le marquage intracellulaire des cytokines a été ajouté. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (BD FACS ARIA III, BD Biosciences) et le logiciel BD FACS Diva. L'analyse des données a été effectuée sur le logiciel FlowJo (Version 9.0).

Dans des tubes de 5mL en Polystyrène pour cytométrie (BD, 352054), 1.10^6 splénocytes ont été mis en contact avec des molécules de co-stimulation : Purified hamster anti-mouse CD28 (clone 37.51, BD Pharmingen #553295), anti-CD49d (clone 9C10 (MFR4.B) BD Pharmingen #553313) puis stimulées avec $2\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptides SIV-Gag, HIV-Env ou SIV-Nef. Afin d'avoir un contrôle positif de stimulation, des cellules ont également été stimulées avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/Ionomycine (Cell stimulation cocktail, eBioscience), permettant l'activation des cellules T par diffusion au travers de la membrane cellulaire. Également, un contrôle négatif - cellules non stimulées (milieu RPMI complet seul), a été effectué en parallèle. Afin de bloquer sécrétion des cytokines dans le compartiment extracellulaire, $5\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brefeldin A (Biolegend #420601) a été ajouté aux cellules. Cette molécule permet d'inhiber le transport des protéines intracellulaire par l'appareil de Golgi. Ainsi, les cytokines produites après stimulation restent bloquées dans la cellule. Après 1h d'incubation à $37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$, $35 \text{ ng}/\text{mL}$ de TAPI-2 (TNF- α Protease Inhibitor 2, Sigma Aldrich) ont été ajoutés à chaque tubes. Cette molécule empêche le clivage de CD62L par le blocage de TNF- α). Après 4h d'incubation, 1 mL de RPMI complet a été ajouté, et les tubes disposés à 4°C durant la nuit.

Après centrifugation (1500 rpm – 5 min) le surnageant a été éliminé et les cellules ont été lavées avec du DPBS puis marquées avec le panel suivant :

Live/dead (Invitrogen): $0.5 \mu\text{L}$ dans 1 mL de PBS. Incubation 20 min à l'obscurité puis lavage 2 fois avec 1.5 mL de FACS buffer (DPBS + 2% SBF)

Purified NA/LE rat anti-mouse CD16/CD32 (Clone 2.4G2, BD Pharmingen #553140) $<1\mu\text{g}/\text{million}$ de cellules dans $100\mu\text{L}$, est ajoutée pour bloquer les récepteurs Fc. Incubation 15 min à 4°C puis lavage avec 1.5mL de FACS Buffer.

Marquage extracellulaire

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Volume pour 1 réaction
CD3	Alexa Fluor 700	17a2	BD Pharmingen	4 μL
CD4	APC-H7	GK1.5	BD Pharmingen	4 μL
CD8a	Brilliant Violet 605	53-6.7	BD Horizon	4 μL
CD127	PE-Cy7	Sb/199	BD Pharmingen	4 μL

CD62L	PE-CF594	Mel-14	BD Horizon	4 µL
-------	----------	--------	------------	------

Les cellules ont été incubées 30 min à températures ambiantes dans l'obscurité, puis lavées avec 1.5 mL de FACS buffer.

Afin de fixer les Ac et de perméabiliser les cellules, 250 µL de tampon Cytofix/Cytoperm (BD #554722) ont été ajoutés et incubés 20 min à 4°C.

Après rinçage avec la solution Fix/Perm Wash 1X (BD), les cellules ont été marquées avec un deuxième panel d'anticorps pour l'identification des cytokines secrétées.

Marquage Intracellulaire

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Volume pour 1 réaction
IFN-γ	Brillant Violet 711	Xmg1.2	BD Horizon	4 µL
IL-21	eFluor450	Ffa21	eBioscience	4 µL
IL-2	APC	Jes6-5H4	eBioscience	4 µL

Les cellules ont de nouveau été incubées 30 min à températures ambiantes dans l'obscurité, puis lavées avec 1.5 mL de FACS buffer. Pour finir, 100 µL de PBS ont été ajoutés dans les tubes avant analyse en cytométrie en flux. En parallèle, un contrôle de compensation a été réalisé à l'aide de billes de compensation anti-rat / anti-hamster IgK (BD CompBeads #552845).

2. Caractérisation des réponses immunes après vaccination sur primates non-humains : macaques Rhésus.

Immunsation des singes :

Six macaques rhésus (*Macaca mulatta*) provenant de la colonie du New Iberia Research Center ont été immunisés au cours de cette étude pré-clinique. Les animaux ont été préalablement génotypés à partir des échantillons de sang périphérique en utilisant le kit QIA amp DNA Blood (Qiagen), notamment pour l'évaluation des gènes du CMH-I, connus pour être des facteurs favorisant le contrôle du virus, et afin de répartir ces profils parmi les groupes.

Également, l'âge ainsi que le poids des animaux sont identifiés pour une répartition égale au sein des groupes.

Un minimum de 2 heures de jeûne a été instauré afin que les singes soient sédatisés en toute sécurité. Une solution de kétamine HCl (10 mg/kg), et/ou Telazol (4-6 mg/kg) a été administrée avant toute manipulation des animaux.

Les macaques ont été répartis comme suit :

	Genre	Poids (kg)	Allèle Mamu A*01	Allèle Mamu B*08	Naissance	Groupe
A9N029	M	11.2	+	-	25 mai 2009	1
A10N143	M	10.4	+	-	15 dec 2010	2
A7N147	M	12.1	-	-	2 nov 2007	2

A11N081	M	17.7	-	-	24 mai 2011	1
DCIN	M	15.2	-	-	1 jan 2008*	2
DE3Z	M	11.6	-	-	1 jan 2009*	1

*estimation

Le schéma de vaccination est établi comme décrit ci-dessous :

Groupe 1 : CAL-SHIV-IN⁻ (2mg/mL dans du PBS)

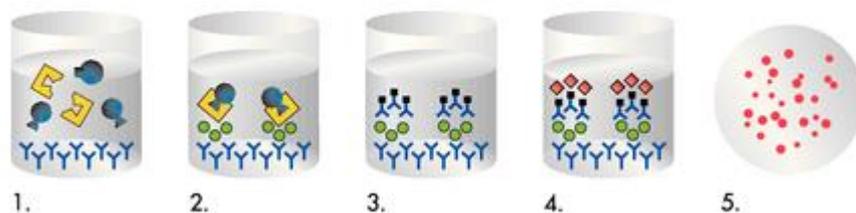
Groupe 2 : CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-7 + CAL-SHIV-IN⁻ IRES rmlL-15 (2mg/mL dans du PBS)

- Injection Intramusculaire (IM) dans les deux quadriceps, 2mg/site, suivi de l'électroporation (Celectra2000, Innovio) 3 pulses de 52msec a 0.5A, 1 sec d'intervalle entre les pulses.
- Injection Intradermale (ID) dans le haut du dos (aire scapulaire - 2 sites), 0.5 mg/site, suivi de l'électroporation (Harvard apparatus BTX T820 Electro square wave porator + Platinum tweezer électrodes 10mm diameter, BTX #45-0119) 6 pulses de 10msec a 110V, 1 sec d'intervalle entre les pulses.

Seize semaines après immunisation, les macaques ont reçu un boost homologue, suivant le même protocole que décrit précédemment.

Évaluation du nombre de cellules productrices d'IFN- γ par test ELISpot

Le test ELISpot IFN- γ est un test immunologique permettant le dénombrement des cellules spécifiques d'un antigène et productrices d'IFN- γ . Son principe consiste à capturer l'IFN- γ sécrété par les cellules après stimulation antigénique sur une membrane de PVDF (polivinyldiene fluoride) sensibilisé avec des anticorps anti-IFN- γ . Après élimination des cellules, le complexe immun est révélé par une méthode ELISA utilisant un substrat chromogène insoluble, dont la précipitation localisée génère des taches colorées appelés immunospots. La méthode ELISpot, grâce à sa haute sensibilité, sa reproductibilité et sa simplicité, reste une technologie de référence pour la mesure des réponses spécifiques à un pathogène ou même pour l'évaluation des réponses spécifiques induites par un vaccin.



D'après Millipore Sigma

Principe du test ELISpot IFN- γ : 1. Les PBMC ainsi que les peptides sont déposés dans les puits préalablement coatés avec les anticorps (Ac) anti-IFN- γ . 2. Les cellules répondant à la stimulation peptidique vont produire la cytokine qui va se fixer aux Ac de la plaque. 3. Les cellules sont éliminées par lavage et les anticorps anti-IFN- γ biotinylés vont se fixer au complexe cytokine/Ac primaire. 4. Le conjugué avidine/phosphatase est ajouté. 5. Le BCIP/NBT, substrat de l'enzyme est ajouté, se traduisant par l'apparition d'un spot violet sur la membrane après séchage complet. Chaque spot est représentatif de la présence d'une cellule sécrétrice d'IFN- γ spécifique de l'antigène de stimulation.

La veille, une plaque 96 puits avec membrane PVDF (Merck millipore #MSHAN4B50) a été sensibilisé avec 50 µL d'anticorps monoclonal anti-IFN-γ (clone 1-D1K ou GZ-4, Mabtech) préalablement dilué dans du DPBS stérile à une concentration finale de 5µg/mL. La plaque a été incubé pendant la nuit à 4°C.

Le lendemain, une étape de lavage a été effectuée à l'aide de 4 fois 200 µL de milieu RPMI complet. La plaque a ensuite été vidée par retournement et égouttée sur du papier absorbant par de légers tapotements.

Une étape de blocage a été réalisée en ajoutant 200 µL de milieu RPMI complet, suivie d'une incubation d'un minimum de 2h dans un incubateur humide, à 37°C et 5% de CO₂.

Les solutions de stimulation ont été préparées, contenant les différents pools de peptides SIV Gag, HIV Env (C terminale) et SIV Nef, à une concentration de 2µg/mL dans un volume final de 100 µL de RPMI complet. Puis, les solutions contenant les cellules ont à leur tour été ajoutées dans les puits, à raison de 2.10⁵ cellules vivantes par puits. Afin de valider le test, des contrôles ont été introduits : des cellules non stimulées (avec du milieu de culture uniquement) afin de détecter le bruit de fond ; ainsi que des cellules stimulées avec de la PhytoHemaglutinine A (PHA, Sigma), connue pour ses propriétés mitogènes sur les cellules T, qui a servi de contrôle positif à la stimulation.

Après 20h de culture à 37°C et 5% de CO₂, la plaque a été lavée 4 fois avec 200 µL de PBS + 0.05% Tween-20 (Fisher #BP337-500) puis incubée 3h à 37°C et 5% de CO₂ avec 50 µL d'anticorps monoclonal biotinylé (clone 7-B6-1, Mabtech) dilué à 1 µg/mL dans une solution de PBS + 0.05% Tween-20 + 1% de sérum de bœuf fœtal (SBF).

Une nouvelle étape de lavage a été entreprise dans les mêmes conditions que précédemment, puis la Streptavidine/Phosphatase alcaline (Mabtech) a été ajouté après dilution au 1/1000 dans une solution de PBS + 0.05% Tween-20 + 1% SBF. Après 2h d'incubation à température ambiante et une nouvelle étape de lavage, 50 µL de substrat BCIP/NBT (Mabtech) a été ajouté après avoir été préalablement filtré avec un filtre de 0.22 µm. La réaction s'est déroulée dans l'obscurité, entre 10 et 20 min, puis stoppé par rinçage avec de l'eau dès l'apparition de spots dans les puits contenant les cellules stimulées par la PHA. La plaque sèche a été imagée avec le lecteur Immunospot S6 Analyzer, Cellular Technology Limited CTL).

Etude du phénotype les PBMC de macaques vaccinés et de la sécrétion de cytokines par présence de l'antigène

Après extraction, 1.10⁶ PBMC ont été stimulés pendant 6 heures avec les peptides Gag, Env ou Nef, puis ont été marqués par un panel d'anticorps afin de mettre en évidence le phénotype des cellules. Après perméabilisation, un second panel pour le marquage intracellulaire des cytokines a été ajouté. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (BD FACS ARIA III, BD Biosciences) et le logiciel BD FACS Diva. L'analyse des données a été effectuée sur le logiciel FlowJo (Version 9.0).

Dans des tubes de 5mL en Polystyrene pour cytométrie (BD, 352054), 1.10^6 splénocytes ont été mis en contact avec des molécules de costimulation : 0.2 µg purified mouse anti-human CD49d/ reaction (BD Pharmingen #556634), CD28-ECD (iOTest #6607111) 3 µL/reaction, puis stimulées avec 2µg/mL de peptides SIV-Gag, HIV-Env ou SIV-Nef. Afin d'avoir un contrôle positif de stimulation, des cellules ont également été stimulées avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/Ionomycine (Cell stimulation cocktail, eBioscience). Également, un contrôle négatif - cellules non stimulées (milieu RPMI complet seul), a été effectué en parallèle. 5 µg/mL de Brefeldin A (Biolegend #420601) a été ajouté aux cellules. Après 6h d'incubation, 1 mL de RPMI complet a été ajouté, et les tubes disposés à 4°C durant la nuit.

Après centrifugation (1500 rpm – 5 min) le surnageant a été éliminé et les cellules ont été lavées avec du DPBS puis marquées avec le panel suivant :

Live/dead (Invitrogen): 0.5 µL dans 1 mL de PBS. Incubation 20 min à l'obscurité puis lavage 2 fois avec 1.5 mL de FACS buffer (DPBS + 2% SBF)

Marquage extracellulaire

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Volume pour 1 réaction
CD3	Alexa Fluor 700	SP34-2	BD Pharmingen	3 µL
CD4	FITC	L200	BD Pharmingen	3 µL
CD8	APC-Cy7	SK1	BD Pharmingen	3 µL
CD95	PerCp-Cy5.5	DX2	BD Pharmingen	3 µL
CD45	APC	D058-1283	BD Horizon	3 µL
CD107a	BV650	H4A3	Biolegend	3 µL

Les cellules ont été incubées 30 min à températures ambiantes dans l'obscurité, puis lavées avec 1.5 mL de FACS buffer. Afin de fixer les Ac et de perméabiliser les cellules, 250 µL de tampon Cytotfix/Cytoperm (BD #512090KZ) ont été ajoutés et incubés 20 min à 4°C.

Après rinçage avec la solution Fix/Perm Wash 1X (BD), les cellules ont été marquées avec un deuxième panel d'anticorps pour l'identification des cytokines secrétées.

Marquage Intracellulaire

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Compagnie	Volume pour 1 réaction
IFN-γ	PE-Cy7	B27	BD Pharmingen	3 µL
TNF-α	BV785	Mab11	Biolegend	3 µL
MIP-1β	V450	D21-1351	BD Horizon	3 µL
Granzyme B	PE	GB11	BD Pharmingen	3 µL
Brilliant buffer plus	Permet de diminuer les artefacts de fluorescence quand plusieurs fluorochromes de la gamme Brilliant Violet sont utilisés.		BD horizon	10 µL

Les cellules ont de nouveau été incubées 30 min à températures ambiantes dans l'obscurité, puis lavées avec 1.5 mL de FACS buffer. Pour finir, 100 µL de PBS ont été ajoutés dans les tubes avant analyse en cytométrie en flux. En parallèle, un contrôle de compensation a été

réalisé à l'aide de billes de compensation anti-mouse anti-IgK (BD CompBeads Positive #51-90-9001229 and negative #51-90-9001291) et Arc (Invitrogen #A10346)

Détection des anticorps totaux et spécifiques du SIV

Les plaques ELISA (fond plat Nunc MaxiSorp™) ont été recouvertes d'anti-Ig ou d'antigène pour tester la sécrétion plasmatique ou rectale afin de détecter les Ig totales ou les IgG et IgA spécifiques. Pour les Ig totales, les plaques ont été recouvertes de 0,25 µg d'IgG + IgA + IgM anti-singe polyclonaux de chèvre (LSBio, USA) dans 100 µL de PBS, pendant 1 h à température ambiante. Pour les Ig spécifiques, les plaques ont été coatées avec 2,5 µg de Concanavaleine A (ConA) (Sigma, USA) diluées dans 100 µL de tampon HEPES 10 mM, puis incubées pendant 1h avec le virus HIV-1_{JR-FL} dilué dans du PBS + 1% triton X100 (Sigma). Les plaques ont été bloquées dans du lait écrémé en poudre (2 %) (Blotting-grade Blocker, BioRad, USA) à 4°C pendant une nuit. Des dilutions en série de 1/50 à 1/6250 ont été utilisées pour déterminer le titre d'Ig dans les échantillons à chaque instant. Des anticorps secondaires (Goat Anti-Monkey IgG gamma Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugated, (Rockland, USA) ou goat Anti-Monkey IgA Biotin Conjugated, (Rockland, USA), plus Avidine-D HRP (Vector Laboratories, USA) ont été utilisés. Du TMB (KPL, USA) a été ajouté à la plaque, et la réaction a été arrêtée avec de l'acide sulfurique 1M et lue immédiatement à 450 nm avec un lecteur ELISA (Synergy HT, Bio-Tek, USA).

Détection des anticorps neutralisants

La lignée cellulaire TZM-bl a été utilisée pour le test de neutralisation. Les échantillons de plasma de macaque prélevés avant la vaccination (semaine 0) et après le rappel (semaine 18) ont été inactivés par la chaleur et préparés à des dilutions en série de raison 5 à partir de 1:10. Les échantillons de plasma dilués ont été incubés avec le virus HIV-1_{JR-FL} Tier 2 (Clade B) pendant 1 h à 37°C, puis utilisés pour inoculer des cellules TZM-bl. L'activité luciférase a été mesurée 48 h après l'infection. La dose inhibitrice de 50 % (ID50) a été évaluée.

Essai de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

Les cellules cibles lymphocytes T CD4+ CEM.NKr-CCR5 expriment la luciférase après infection par le VIH-1. Les cellules NK KHYG-1 exprimant CD16 ont servi de cellules effectrices. Pour mesurer l'ADCC, les cellules cibles ont été infectées avec 50 ng de virus HIV-1_{JR-FL} par spinoculation et cultivées pendant 4 jours. Des dilutions en série des échantillons de plasma de raison deux ont été ajoutées aux cibles infectées pendant 20 min à température ambiante dans des plaques à 96 puits à fond rond. Des cellules effectrices KHYG-1 ont été ajoutées à un rapport effecteur : cible de 10 : 1 et incubées pendant 8 heures supplémentaires. Les cellules ont été lysées et la RLU a été mesurée immédiatement sur un luminomètre BioTek. L'activité ADCC a été calculée comme suit : (RLU moyenne à une dilution plasmatique donnée - RLU de fond moyenne) / (RLU maximale moyenne - RLU de fond moyenne) × 100.

Projet 2 :

Préparation des antigènes

Nous avons utilisé les cinq vaccins commerciaux suivants ont été utilisés comme source antigénique pour stimuler les PBMC lors des tests : BCG, Varilrix, IMOVAX POLIO, VaxigripTetraR et Engerix B contre mycobacterium tuberculosis, le virus varicelle-zona, le poliovirus, la grippe et le virus de l'hépatite B, respectivement, comme source antigénique pour les tests de stimulation.

Le vaccin Bacille-Calmette-Guérin (BCG) (C5632AA, SANOFI PASTEUR/Sanofi-Pasteur) consiste en une solution bactérienne vivante atténuée de Mycobacterium bovis (50 µg/0,1 mL – 1,5-6.10⁵ unités viables de souche Moreau (Brésil). les bactéries sont affaiblies Mycobacterium bovis qui infecte habituellement les vaches et d'autres animaux Il est étroitement apparenté à Mycobacterium tuberculosis mais ne provoque pas d'infection pathogène productive chez l'homme en bonne santé La suspension bactérienne a d'abord été inactivée à 60 ° C pendant 1 heure, puis soniquée avec 5 impulsions, d'une seconde chacune. Entre chacune des 5 impulsions, la suspension a été incubée 2-3 min sur de la glace pour éviter la surchauffe de la solution vaccinale due à l'accélération physique. Enfin, la solution bactérienne inactivée/soniquée a été aliquotée et conservée au congélateur à -20 °C.

VARILRIX (A7OCD348D, GSK) et VARIVAX (Sanofi Pasteur) sont un vaccin commercial contre le virus varicelle-zona (VZV) responsable de la varicelle chez les personnes de plus de 12 ans. Le vaccin est composé de VZV vivant atténué lyophilisé (souche Oka/Merck VZV) > 1350 UFP/0,5 ml et 103,3 UFP/0,5 ml, respectivement. Le vaccin a été inactivé à 56°C, pendant 45 min pour abroger l'infectivité du virus tout en préservant son immunogénicité. Des aliquotes de virus inactivé ont été conservées à -20°C.

Détection des cellules productrices d'IFN-γ par test ELISpot

Un kit commercial ELISpot humain (Mabtech, France) a été utilisé pour évaluer le nombre de cellules sécrétant de l'IFN-γ en réponse aux antigènes des différents vaccins. 2,5 x 10⁶ PBMC décongelées ont été incubées par puits pendant 18 à 20 heures avec des vaccins BCG, VZV, Polio, Grippe ou VHB, du milieu seul (utilisé comme contrôle négatif) ou du milieu contenant de la concanavaline A (utilisé comme contrôle positif) . Les spots ont été comptés à l'aide d'un système de lecture automatisé ELISpot (Bioreader 100β, Biosys). Les résultats sont présentés sous forme de nombre moyen de cellules formant des taches IFN-γ (SFC) par million de PBMC et ont été calculés à partir de puits en triplicats après soustraction du nombre moyen des puits témoins en triplicats également (milieu seul). Les échantillons ont été notés comme positifs lorsque le nombre net ajusté dépassait 50 SFC par million de PBMCs.

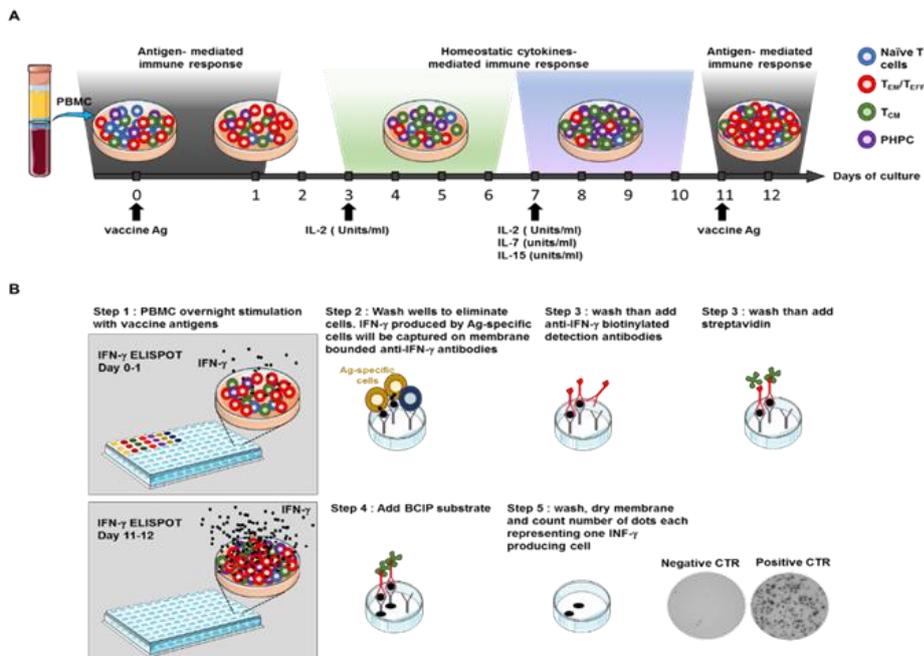
Détection de précurseurs à haute capacité proliférative à l'aide du test PHPC.

Des PBMC, remis en suspension dans du milieu AIM-V sans sérum (Gibco) ont été ensemencés dans des plaques de culture tissulaire à 24 puits à une densité de 1,10⁶ cellules/ml/puits en présence ou en l'absence d'antigènes stimulateurs. Au jour 3, les cultures ont été supplémentées avec de l'IL-2 simienne (10 U/ml, Sigma Aldrich) uniquement et au jour 7 avec un cocktail contenant de l'IL-2 simienne (10 U/mL), de l'IL-7 (500 ng/mL, offert par Cytheris, Yssy-les-Moulineaux, France) et IL-15 (10 U/ml, de la Resource for NHP

immuno Reagents)). Au jour 11, les cellules ont été lavées, comptées et utilisées pour le test ELISpot. Des PBMC vivantes (2×10^4) ont été ensemencées en triplicats dans des puits ELISpot pour quantifier le nombre de cellules effectrices spécifiques sécrétant de l'IFN- γ et qui ont été développées à partir de précurseurs (PHPC) qui ont proliféré et se sont différenciés au cours de la culture avec des cytokines et des antigènes. La procédure de détection des cellules productrices d'IFN- γ est exactement comme décrite ci-dessus pour le test ELISpot. Le nombre de cellules effectrices spécifiques produisant de l'IFN- γ et qui ont été développées à partir de précurseurs (PHPC) qui ont proliféré et différencié au cours de la culture avec des cytokines et des antigènes a été noté

Test de viabilité cellulaire

Les PBMC ont été cultivées pendant 12 jours dans les conditions de dosage PHPC précédemment décrites et stimulées avec des antigènes HBV ou Flu. À divers moments (jour 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11 et 12), la viabilité des cellules cultivées a été caractérisée à l'aide du compteur de cellules automatisé Luna (biosystème Logos) avec l'Acridine Orange



Présentation schématique du test PHPC. Les cellules sécrétant de l'IFN- γ seront détectées ex-vivo directement ou après 12 jours de culture prolongée en présence de cytokines homéostatiques (IL-2, IL-7 et IL-15) et de stimulant antigénique. A : chronologie du test PHPC. Les flèches indiquent le temps des stimulations. B : Schéma du test PHPC par étape.

Résumé

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV)-1 reste un problème majeur de santé publique dans le monde. Malgré des thérapies antivirales efficaces permettant d'allonger la durée de vie des patients infectés par HIV-1, aucun vaccin capable de protéger de l'acquisition du virus ou guérir l'infection n'a été homologué. Nous avons développé un vaccin lentiADN innovant, basé sur le squelette du SHIV_{KU2}, et dépourvu du gène de l'intégrase (CAL-SHIV-IN⁻). Dans nos études précédentes, nous avons démontré la capacité de ce lentiADN à induire des réponses persistantes composées de cellules précurseurs CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de Gag et Nef, de cellules centrales mémoires (Tcm) et de cellules effectrices mémoires (Tem) jusqu'à 80 semaines après l'immunisation chez les macaques cynomolgus. Pour évaluer si ces pools mémoires de cellules peuvent être amplifiés, une cassette contenant le gène IL-7 ou IL-15 a été insérée dans le lentiADN. Les réponses humorales et cellulaires induites par les deux CAL-SHIV-IN⁻ IRES-IL-7 et CAL-SHIV-IN⁻ IRES-IL15 co-injectés ont été comparées à celles induites par le lentiADN parental CAL-SHIV-IN⁻.

Des souris BALB/c et des macaques rhésus ont été immunisés avec les lentiADN plasmidiques, respectivement, et des rappels homologues ont été effectués à 6 et 16 semaines post-immunisation, respectivement.

Nos résultats démontrent que la co-administration de CAL-SHIV-IN⁻ IRES-IL-7 et CAL-SHIV-IN⁻ IRES-IL15 entraînaient une production conséquente de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de Gag et Nef chez les souris et les macaques. Le suivi jusqu'à 40 semaines chez les macaques a mis en évidence leur capacité de réponse à long terme. En outre, la sécrétion de Granzyme B et MIP-1 β par les cellules Tcm et Tem spécifiques de Gag ont été amplifiées. De plus, des anticorps plasmatiques IgG non-neutralisants dotés de fonction ADCC ainsi que de fortes réponses IgA muco-sales ont été détectés jusqu'à 40 semaines après l'immunisation et renforcés par les adjuvants cytokines chez les macaques.

Nous pouvons conclure que la co-expression de l'IL-7 et de l'IL-15 avec les antigènes de notre vaccin lentiADN a entraîné une augmentation de la proportion et de la longévité des cellules T mémoire CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au vaccin dans les splénocytes de souris et les PBMC de macaque. En parallèle, il a également provoqué des réponses IgG plasmatiques de longue durée, avec les IgA et IgG muco-saux dans les sécrétions rectales.

Summary

HIV-1 remains a major public health problem all over the world despite efficacious antiviral therapies, but in absence of a vaccine. We developed an innovative lentiDNA vaccine based on the backbone of SHIV-KU2, lacking the integrase gene (CAL-SHIV- Δ IN). In our earlier studies we demonstrated persistent Gag- and Nef-specific CD4⁺ and CD8⁺ T precursors (PHPC), central memory (T_{cm}) and effector memory (T_{em}) cells up to 80 weeks post-immunization in Cynomolgus macaques. In attempt to amplify further these memory pools of cells, a cassette containing IL-7 or IL-15 gene was inserted into the lentiDNA. Humoral and cellular responses elicited by the two co-injected CAL-SHIV- Δ IN IRES-IL-7 and CAL-SHIV- Δ IN IRES-IL15 were compared with those elicited by the parental lentiDNA.

BALB/c mice and Rhesus macaques were immunized with plasmid DNA respectively, with homologous boosts at 6 and 16 weeks post-immunization, respectively.

We found that co-administered CAL-SHIV- Δ IN IRES-IL-7 and CAL-SHIV- Δ IN IRES-IL15 elicited potent Gag- and Nef-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells both in mice and macaques. The follow-up up to 40 weeks in macaques highlighted the long-term response capacity. Also, Gag-specific T_{cm} and T_{em} secreting Granzyme B and MIP-1 β were enhanced. Furthermore, non-neutralizing plasma IgG antibodies with ADCC function as well as strong mucosal IgA responses were detected up to 40 weeks post-immunization and enhanced by the adjuvant cytokines in macaques.

In conclusion, co-expression of IL-7 and IL-15 with antigens of our lentiDNA vaccine resulted in augmented proportion and longevity of vaccine-specific CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells in mouse spleen cells and macaque PBMCs. Concomitantly it also elicited long-lasting responses of plasma IgG together with mucosal IgA and IgG in rectal secretions.

Références bibliographiques

1. Tang, H., K.L. Kuhen, and F. Wong-Staal, *Lentivirus replication and regulation*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 133-70.
2. Sauter, D. and F. Kirchhoff, *Key Viral Adaptations Preceding the AIDS Pandemic*. Cell Host Microbe, 2019. **25**(1): p. 27-38.
3. Bell, S.M. and T. Bedford, *Modern-day SIV viral diversity generated by extensive recombination and cross-species transmission*. PLoS Pathog, 2017. **13**(7): p. e1006466.
4. Mir, K.D., et al., *SIV infection in natural hosts: resolution of immune activation during the acute-to-chronic transition phase*. Microbes Infect, 2011. **13**(1): p. 14-24.
5. Etienne, L., *[The adaptation of lentiviruses to apes was a crucial step in the origin of HIV-1]*. Med Sci (Paris), 2014. **30**(1): p. 24-6.
6. Silvestri, G., et al., *Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3148-54.
7. Lederer, S., et al., *Transcriptional profiling in pathogenic and non-pathogenic SIV infections reveals significant distinctions in kinetics and tissue compartmentalization*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000296.
8. Lara E. Pereira, P.S.a.J.M.S., *Simian-Human Immunodeficiency Viruses and Their Impact on Non-Human Primate Models for AIDS*. Immunodeficiency, 2012.
9. Pépin, J., *The origins of AIDS: from patient zero to ground zero*. Journal of Epidemiology and Community Health, 2013: p. jech-2012-201423.
10. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1552): p. 2487-94.
11. Tebit, D.M. and E.J. Arts, *Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(1): p. 45-56.
12. Brennan, R.O. and D.T. Durack, *Gay compromise syndrome*. Lancet, 1981. **2**(8259): p. 1338-9.
13. *Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1982. **31**(26): p. 353-4, 360-1.
14. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
15. Zhu, T., et al., *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 594-7.
16. Visseaux, B., et al., *[Physiopathology of HIV-2 infection]*. Virologie (Montrouge), 2019. **23**(5): p. 277-291.
17. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(3): p. 203-22.
18. Clapham, P.R. and A. McKnight, *Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 8): p. 1809-1829.
19. Waters, L., et al., *The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(10): p. 1617-23.
20. José A Esté, A.T., *HIV entry inhibitors*. The Lancet, 2007. **370**(9581): p. 81-88.
21. Hayashida, T., et al., *Emergence of CXCR4-tropic HIV-1 variants followed by rapid disease progression in hemophilic slow progressors*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177033.
22. Connell, B.J., et al., *Immune activation correlates with and predicts CXCR4 co-receptor tropism switch in HIV-1 infection*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 15866.
23. Vanhamel, J., A. Bruggemans, and Z. Debyser, *Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know?* J Virus Erad, 2019. **5**(1): p. 3-9.

24. Yassen, A., et al., *HIV internalization into oral and genital epithelial cells by endocytosis and macropinocytosis leads to viral sequestration in the vesicles*. *Virology*, 2018. **515**: p. 92-107.
25. Prabhu, V.M., et al., *Vaginal Epithelium Transiently Harbours HIV-1 Facilitating Transmission*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021. **11**: p. 634647.
26. Lien, K., et al., *HIV-1 proteins gp120 and tat induce the epithelial-mesenchymal transition in oral and genital mucosal epithelial cells*. *PLoS One*, 2019. **14**(12): p. e0226343.
27. Engels, E.A., et al., *Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(1): p. 187-94.
28. Duncan, S.R., S. Scott, and C.J. Duncan, *Reappraisal of the historical selective pressures for the CCR5-Delta32 mutation*. *J Med Genet*, 2005. **42**(3): p. 205-8.
29. Gupta, R.K., et al., *HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation*. *Nature*, 2019. **568**(7751): p. 244-248.
30. *Correction to Lancet Infect Dis 2020; published online March 11, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30144-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30144-4)*. *Lancet Infect Dis*, 2020. **20**(5): p. e79.
31. Moir, S., T.W. Chun, and A.S. Fauci, *Pathogenic mechanisms of HIV disease*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 223-48.
32. Este, J.A. and A. Telenti, *HIV entry inhibitors*. *Lancet*, 2007. **370**(9581): p. 81-8.
33. Pu, J., et al., *Development of Protein- and Peptide-Based HIV Entry Inhibitors Targeting gp120 or gp41*. *Viruses*, 2019. **11**(8).
34. Bohne, J., H. Wodrich, and H.G. Krausslich, *Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(3): p. 825-37.
35. Shcherbatova, O., et al., *Modeling of the HIV-1 Life Cycle in Productively Infected Cells to Predict Novel Therapeutic Targets*. *Pathogens*, 2020. **9**(4).
36. Han, Y., et al., *Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes*. *J Virol*, 2004. **78**(12): p. 6122-33.
37. Sengupta, S. and R.F. Siliciano, *Targeting the Latent Reservoir for HIV-1*. *Immunity*, 2018. **48**(5): p. 872-895.
38. Gerard, A., et al., *The integrase cofactor LEDGF/p75 associates with Iws1 and Spt6 for postintegration silencing of HIV-1 gene expression in latently infected cells*. *Cell Host Microbe*, 2015. **17**(1): p. 107-17.
39. Razooky, B.S., et al., *A hardwired HIV latency program*. *Cell*, 2015. **160**(5): p. 990-1001.
40. Huang, S.H., et al., *Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(2): p. 876-889.
41. Henderson, L.J., et al., *Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs*. *J Virol*, 2020. **94**(3).
42. Ganor, Y., et al., *HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy*. *Nat Microbiol*, 2019. **4**(4): p. 633-644.
43. Churchill, M.J., et al., *HIV reservoirs: what, where and how to target them*. *Nat Rev Microbiol*, 2016. **14**(1): p. 55-60.
44. Castro-Gonzalez, S., M. Colomer-Lluch, and R. Serra-Moreno, *Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2018. **34**(9): p. 739-759.
45. Wong, M.E., A. Jaworowski, and A.C. Hearps, *The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1435.
46. Martin-Moreno, A. and M.A. Munoz-Fernandez, *Dendritic Cells, the Double Agent in the War Against HIV-1*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2485.

47. DeLucia, D.C., C.R. Rinaldo, and G. Rappocciolo, *Inefficient HIV-1 trans Infection of CD4(+) T Cells by Macrophages from HIV-1 Nonprogressors Is Associated with Altered Membrane Cholesterol and DC-SIGN*. J Virol, 2018. **92**(13).
48. Symons, J., P.U. Cameron, and S.R. Lewin, *HIV integration sites and implications for maintenance of the reservoir*. Curr Opin HIV AIDS, 2018. **13**(2): p. 152-159.
49. Pierson, T., J. McArthur, and R.F. Siliciano, *Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 665-708.
50. Marsden, M.D. and J.A. Zack, *Establishment and maintenance of HIV latency: model systems and opportunities for intervention*. Future Virol, 2010. **5**(1): p. 97-109.
51. Whyte-Allman, S.K. and R. Bendayan, *HIV-1 Sanctuary Sites-the Role of Membrane-Associated Drug Transporters and Drug Metabolic Enzymes*. AAPS J, 2020. **22**(5): p. 118.
52. Bednar, M.M., et al., *Compartmentalization, Viral Evolution, and Viral Latency of HIV in the CNS*. Curr HIV/AIDS Rep, 2015. **12**(2): p. 262-71.
53. Wallet, C., et al., *Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 362.
54. Ko, A., et al., *Macrophages but not Astrocytes Harbor HIV DNA in the Brains of HIV-1-Infected Aviremic Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy*. J Neuroimmune Pharmacol, 2019. **14**(1): p. 110-119.
55. Lutgen, V., et al., *HIV infects astrocytes in vivo and egresses from the brain to the periphery*. PLoS Pathog, 2020. **16**(6): p. e1008381.
56. Hong, S. and W.A. Banks, *Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications*. Brain Behav Immun, 2015. **45**: p. 1-12.
57. Le Tortorec, A. and N. Dejuqc-Rainsford, *[Infection of semen-producing organs by HIV and role in virus dissemination]*. Med Sci (Paris), 2010. **26**(10): p. 861-8.
58. Stein, J., M. Storcksdieck Genannt Bonsmann, and H. Streeck, *Barriers to HIV Cure*. HLA, 2016. **88**(4): p. 155-63.
59. Le Tortorec, A. and N. Dejuqc-Rainsford, *[The male genital tract: A host for HIV]*. Gynecol Obstet Fertil, 2007. **35**(12): p. 1245-50.
60. Wu, S., et al., *HIV-1 Establishes a Sanctuary Site in the Testis by Permeating the BTB Through Changes in Cytoskeletal Organization*. Endocrinology, 2021. **162**(11).
61. Thompson, C.G., C.L. Gay, and A.D.M. Kashuba, *HIV Persistence in Gut-Associated Lymphoid Tissues: Pharmacological Challenges and Opportunities*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2017. **33**(6): p. 513-523.
62. Chatzidimitriou, D., et al., *HIV-1: towards understanding the nature and quantifying the latent reservoir*. Acta Virol, 2020. **64**(1): p. 3-9.
63. Massanella, M., et al., *Long-term effects of early antiretroviral initiation on HIV reservoir markers: a longitudinal analysis of the MERLIN clinical study*. Lancet Microbe, 2021. **2**(5): p. e198-e209.
64. Greener, B.N., et al., *Dolutegravir pharmacokinetics in the genital tract and colorectum of HIV-negative men after single and multiple dosing*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **64**(1): p. 39-44.
65. Patterson, K.B., et al., *Differential penetration of raltegravir throughout gastrointestinal tissue: implications for eradication and cure*. AIDS, 2013. **27**(9): p. 1413-9.
66. Shen, L. and R.F. Siliciano, *Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(1): p. 22-8.
67. Joag, S.V., et al., *Characterization of the pathogenic KU-SHIV model of acquired immunodeficiency syndrome in macaques*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997. **13**(8): p. 635-45.

68. Reimann, K.A., et al., *Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8878-85.
69. Joag, S.V., et al., *Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 4016-23.
70. Buch, S.J., et al., *Innate differences between simian-human immunodeficiency virus (SHIV)(KU-2)-infected rhesus and pig-tailed macaques in development of neurological disease*. Virology, 2002. **295**(1): p. 54-62.
71. Tartaglia, L.J., et al., *Differential Outcomes following Optimization of Simian-Human Immunodeficiency Viruses from Clades AE, B, and C*. J Virol, 2020. **94**(10).
72. Li, H., et al., *New SHIVs and Improved Design Strategy for Modeling HIV-1 Transmission, Immunopathogenesis, Prevention and Cure*. J Virol, 2021.
73. Holterman, L., et al., *The rate of progression to AIDS is independent of virus dose in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 7): p. 1719-26.
74. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
75. Fiebig, E.W., et al., *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1871-9.
76. Klatt, E.C., *PATHOLOGY OF HIV/AIDS*, 2020, Mercer University School of Medicine Savannah, Georgia, USA.
77. Kandi Venkataramana, *A Study of Biological Markers in HIV Disease Progression and Management in the Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) Era*. American Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013. **1**(2): p. 24-37.
78. Perfettini, J.L., et al., *Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 1**: p. 916-23.
79. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
80. Lama, J. and V. Planelles, *Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression*. Retrovirology, 2007. **4**: p. 52.
81. Muller, V., C. Fraser, and J.T. Herbeck, *A strong case for viral genetic factors in HIV virulence*. Viruses, 2011. **3**(3): p. 204-16.
82. Fauci, A.S., *Pathogenesis of HIV disease: opportunities for new prevention interventions*. Clin Infect Dis, 2007. **45 Suppl 4**: p. S206-12.
83. Kaur, G. and N. Mehra, *Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection*. Tissue Antigens, 2009. **73**(4): p. 289-301.
84. Kumar, P., *Long term non-progressor (LTNP) HIV infection*. Indian J Med Res, 2013. **138**(3): p. 291-3.
85. Elahi, S., et al., *Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression*. Nat Med, 2011. **17**(8): p. 989-95.
86. Imami, N., et al., *Long-Term Non-Progression and Broad HIV-1-Specific Proliferative T-Cell Responses*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 58.
87. Pereyra, F., et al., *Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy*. J Infect Dis, 2008. **197**(4): p. 563-71.
88. Pina, A.F., et al., *Non-polarized cytokine profile of a long-term non-progressor HIV infected patient*. Braz J Infect Dis, 2018. **22**(2): p. 142-145.
89. Saez-Cirion, A., et al., *Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7828-37.

90. Adams, P., et al., *Cytotoxic CD8+ T Cells Expressing CXCR5 Are Detectable in HIV-1 Elite Controllers After Prolonged In Vitro Peptide Stimulation*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 622343.
91. Lichtenfeld, M., et al., *Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors*. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3679-87.
92. Angin, M., et al., *Metabolic plasticity of HIV-specific CD8(+) T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection*. *Nat Metab*, 2019. **1**(7): p. 704-716.
93. Daniel, M.D., et al., *Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene*. *Science*, 1992. **258**(5090): p. 1938-41.
94. Wang, B., *Viral factors in non-progression*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 355.
95. Desimie, B.A., et al., *Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all*. *J Mol Biol*, 2014. **426**(6): p. 1220-45.
96. Farrow, M.A. and A.M. Sheehy, *Vif and Apobec3G in the innate immune response to HIV: a tale of two proteins*. *Future Microbiol*, 2008. **3**(2): p. 145-54.
97. Delviks-Frankenberry, K.A., et al., *Development of Lentiviral Vectors for HIV-1 Gene Therapy with Vif-Resistant APOBEC3G*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019. **18**: p. 1023-1038.
98. Adolph, M.B., J. Webb, and L. Chelico, *Retroviral restriction factor APOBEC3G delays the initiation of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64196.
99. Ganser-Pornillos, B.K. and O. Pornillos, *Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5*. *Nat Rev Microbiol*, 2019. **17**(9): p. 546-556.
100. Jimenez-Guardeno, J.M., et al., *Immunoproteasome activation enables human TRIM5alpha restriction of HIV-1*. *Nat Microbiol*, 2019. **4**(6): p. 933-940.
101. Jia, X., Q. Zhao, and Y. Xiong, *HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion*. *Curr Opin Struct Biol*, 2015. **31**: p. 106-14.
102. Ryoo, J., et al., *The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction*. *Nat Med*, 2014. **20**(8): p. 936-41.
103. Su, B., et al., *Potential Application of MicroRNA Profiling to the Diagnosis and Prognosis of HIV-1 Infection*. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 3185.
104. Ahluwalia, J.K., et al., *Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication*. *Retrovirology*, 2008. **5**: p. 117.
105. Huang, J., et al., *Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes*. *Nat Med*, 2007. **13**(10): p. 1241-7.
106. Sanchez-Del Cojo, M., et al., *Changes in the cellular microRNA profile by the intracellular expression of HIV-1 Tat regulator: A potential mechanism for resistance to apoptosis and impaired proliferation in HIV-1 infected CD4+ T cells*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0185677.
107. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
108. Chang, J.J. and M. Altfeld, *TLR-mediated immune activation in HIV*. *Blood*, 2009. **113**(2): p. 269-70.
109. Lester, S.N. and K. Li, *Toll-like receptors in antiviral innate immunity*. *J Mol Biol*, 2014. **426**(6): p. 1246-64.
110. Unterholzner, L., *The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors?* *Immunobiology*, 2013. **218**(11): p. 1312-21.
111. Huot, N., et al., *SIV-induced terminally differentiated adaptive NK cells in lymph nodes associated with enhanced MHC-E restricted activity*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 1282.
112. Vieillard, V., et al., *Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2010. **53**(5): p. 564-73.

113. Brunetta, E., et al., *The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3822-30.
114. Rodriguez-Plata, M.T., et al., *The infectious synapse formed between mature dendritic cells and CD4(+) T cells is independent of the presence of the HIV-1 envelope glycoprotein*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 42.
115. Moir, S. and A.S. Fauci, *B-cell responses to HIV infection*. Immunol Rev, 2017. **275**(1): p. 33-48.
116. Seifert, M. and R. Kuppers, *Human memory B cells*. Leukemia, 2016. **30**(12): p. 2283-2292.
117. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
118. Noto, A. and G. Pantaleo, *B-cell abnormalities and impact on antibody response in HIV infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2017. **12**(3): p. 203-208.
119. van Woudenberg, E., et al., *HIV Is Associated with Modified Humoral Immune Responses in the Setting of HIV/TB Coinfection*. mSphere, 2020. **5**(3).
120. Dufloo, J., et al., *Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies tether viral particles at the surface of infected cells*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 630.
121. Williams, W.B., et al., *Strategies for induction of HIV-1 envelope-reactive broadly neutralizing antibodies*. J Int AIDS Soc, 2021. **24 Suppl 7**: p. e25831.
122. Mascola, J.R., et al., *Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 207-10.
123. Shibata, R., et al., *Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 204-10.
124. Klein, F., et al., *Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy*. Science, 2013. **341**(6151): p. 1199-204.
125. Sliepen, K. and R.W. Sanders, *HIV-1 envelope glycoprotein immunogens to induce broadly neutralizing antibodies*. Expert Rev Vaccines, 2016. **15**(3): p. 349-65.
126. Del Moral-Sanchez, I. and K. Sliepen, *Strategies for inducing effective neutralizing antibody responses against HIV-1*. Expert Rev Vaccines, 2019. **18**(11): p. 1127-1143.
127. Kwong, P.D. and J.R. Mascola, *HIV-1 Vaccines Based on Antibody Identification, B Cell Ontogeny, and Epitope Structure*. Immunity, 2018. **48**(5): p. 855-871.
128. Gautam, R., et al., *A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges*. Nature, 2016. **533**(7601): p. 105-109.
129. Ko, S.Y., et al., *Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection*. Nature, 2014. **514**(7524): p. 642-5.
130. McFarland, E.J., et al., *Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of a Long-Acting Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Monoclonal Antibody VRC01LS in HIV-1-Exposed Newborn Infants*. J Infect Dis, 2021. **224**(11): p. 1916-1924.
131. Willey, S., et al., *Extensive complement-dependent enhancement of HIV-1 by autologous non-neutralising antibodies at early stages of infection*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 16.
132. Gorlani, A. and D.N. Forthal, *Antibody-dependent enhancement and the risk of HIV infection*. Curr HIV Res, 2013. **11**(5): p. 421-6.
133. Lugli, E., et al., *Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 594-9.
134. Ahmed, R., et al., *Human Stem Cell-like Memory T Cells Are Maintained in a State of Dynamic Flux*. Cell Rep, 2016. **17**(11): p. 2811-2818.

135. Lugli, E., et al., *Paths to expansion: Differential requirements of IRF4 in CD8(+) T-cell expansion driven by antigen and homeostatic cytokines*. Eur J Immunol, 2018. **48**(8): p. 1281-1284.
136. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
137. Tubo, N.J. and M.K. Jenkins, *CD4+ T Cells: guardians of the phagosome*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(2): p. 200-13.
138. Geginat, J., et al., *Plasticity of human CD4 T cell subsets*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 630.
139. Migueles, S.A. and M. Connors, *Success and failure of the cellular immune response against HIV-1*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 563-70.
140. Giorgi, J.V., et al., *Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 859-70.
141. Leng, Q., et al., *Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **27**(4): p. 389-97.
142. Schmitt, N., et al., *Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 158-69.
143. Baumjohann, D., T. Okada, and K.M. Ansel, *Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2089-92.
144. Xu, H., et al., *Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Drives Differentiation, Aberrant Accumulation, and Latent Infection of Germinal Center Follicular T Helper Cells*. J Virol, 2016. **90**(3): p. 1578-87.
145. Fukazawa, Y., et al., *B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 132-9.
146. Moukambi, F., et al., *Early Loss of Splenic Tfh Cells in SIV-Infected Rhesus Macaques*. PLoS Pathog, 2015. **11**(12): p. e1005287.
147. Xu, H., et al., *Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Causes Ultimate Depletion of Follicular Th Cells in AIDS*. J Immunol, 2015. **195**(9): p. 4351-7.
148. Yamamoto, T., et al., *Quality and quantity of TFH cells are critical for broad antibody development in SHIVAD8 infection*. Sci Transl Med, 2015. **7**(298): p. 298ra120.
149. Williams, M.A. and M.J. Bevan, *Effector and memory CTL differentiation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 171-92.
150. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
151. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
152. Schmitz, J.E., et al., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5403): p. 857-60.
153. Hersperger, A.R., et al., *Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3799-808.
154. Kawada, M., et al., *Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4+ T-cell preservation after nonsterile protection by a cytotoxic T-lymphocyte-based vaccine*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 5202-11.
155. Lee, W.S. and S.J. Kent, *Anti-HIV-1 antibody-dependent cellular cytotoxicity: is there more to antibodies than neutralization?* Curr Opin HIV AIDS, 2018. **13**(2): p. 160-166.
156. Richard, J., et al., *Impact of HIV-1 Envelope Conformation on ADCC Responses*. Trends Microbiol, 2018. **26**(4): p. 253-265.

157. Veillette, M., et al., *The HIV-1 gp120 CD4-bound conformation is preferentially targeted by antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies in sera from HIV-1-infected individuals*. J Virol, 2015. **89**(1): p. 545-51.
158. Worley, M.J., et al., *Neutrophils mediate HIV-specific antibody-dependent phagocytosis and ADCC*. J Immunol Methods, 2018. **457**: p. 41-52.
159. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
160. Seval, N., C. Frank, and M. Kozal, *Fostemsavir for the treatment of HIV*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021: p. 1-6.
161. Mostashari Rad, T., L. Saghaie, and A. Fassihi, *HIV-1 Entry Inhibitors: A Review of Experimental and Computational Studies*. Chem Biodivers, 2018. **15**(10): p. e1800159.
162. Singh, K., S.G. Sarafianos, and A. Sonnerborg, *Long-Acting Anti-HIV Drugs Targeting HIV-1 Reverse Transcriptase and Integrase*. Pharmaceuticals (Basel), 2019. **12**(2).
163. Scevola, S., J.M. Tiraboschi, and D. Podzamczar, *Nothing is perfect: the safety issues of integrase inhibitor regimens*. Expert Opin Drug Saf, 2020. **19**(6): p. 683-694.
164. Cocohoba, J. and B.J. Dong, *Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor*. Clin Ther, 2008. **30**(10): p. 1747-65.
165. Shafer, R.W., et al., *A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies*. HIV Seq Compend, 2001. **2001**: p. 1-51.
166. Nijhuis, M., S. Deeks, and C. Boucher, *Implications of antiretroviral resistance on viral fitness*. Curr Opin Infect Dis, 2001. **14**(1): p. 23-8.
167. Kempf, D.J., et al., *Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(3): p. 654-60.
168. Maldarelli, F., et al., *HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. Science, 2014. **345**(6193): p. 179-83.
169. Wu, V.H., et al., *Assessment of HIV-1 integration in tissues and subsets across infection stages*. JCI Insight, 2020. **5**(20).
170. Ren, Y., et al., *BCL-2 antagonism sensitizes cytotoxic T cell-resistant HIV reservoirs to elimination ex vivo*. J Clin Invest, 2020. **130**(5): p. 2542-2559.
171. Celum, C. and J. Baeten, *PrEP for HIV Prevention: Evidence, Global Scale-up, and Emerging Options*. Cell Host Microbe, 2020. **27**(4): p. 502-506.
172. Molina, J.M., et al., *On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2015. **373**(23): p. 2237-46.
173. Molina, J.-M. *Upping the ante: Prevention for impact*. in *10e conférence mondiale sur l'infection à VIH IAS*. 2019. Mexico city.
174. Clement, M.E., R. Kofron, and R.J. Landovitz, *Long-acting injectable cabotegravir for the prevention of HIV infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2020. **15**(1): p. 19-26.
175. Gorry, P.R., et al., *Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo*. Retrovirology, 2007. **4**: p. 66.
176. Ruth M. Ruprecht, T.W.B., An Li, Seyoum Ayehunie, Yuwen Hu, Vladimir Liska, Robert Rasmussen, Prem L.Sharma, *Live attenuated HIV as a vaccine for AIDS: pros and cons*. Seminars in Virology, 1996. **7**(2): p. 147-155.
177. Baba, T.W., et al., *Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1820-5.
178. Carnathan, D.G., et al., *Intragastric Administration of Lactobacillus plantarum and 2,2'-Dithiodipyridine-Inactivated Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Does Not Protect Indian Rhesus Macaques from Intrarectal SIV Challenge or Reduce Virus Replication after Transmission*. J Virol, 2018. **92**(10).

179. Ng'uni, T., C. Chasara, and Z.M. Ndhlovu, *Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 590780.
180. Vzorov, A.N. and R.W. Compans, [*VLP vaccines and effects of HIV-1 Env protein modifications on their antigenic properties*]. Mol Biol (Mosk), 2016. **50**(3): p. 406-15.
181. Chen, C.W., N. Saubi, and J. Joseph-Munne, *Design Concepts of Virus-Like Particle-Based HIV-1 Vaccines*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 573157.
182. Tohidi, F., et al., *Induction of a Robust Humoral Response using HIV-1 VLP(MPER-V3) as a Novel Candidate Vaccine in BALB/c Mice*. Curr HIV Res, 2019. **17**(1): p. 33-41.
183. Cohen, Y.Z. and R. Dolin, *Novel HIV vaccine strategies: overview and perspective*. Ther Adv Vaccines, 2013. **1**(3): p. 99-112.
184. Bloom, K., F. van den Berg, and P. Arbuthnot, *Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases*. Gene Ther, 2021. **28**(3-4): p. 117-129.
185. Vogel, A.B., et al., *Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses*. Mol Ther, 2018. **26**(2): p. 446-455.
186. Huang, D., et al., *B cells expressing authentic naive human VRC01-class BCRs can be recruited to germinal centers and affinity mature in multiple independent mouse models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(37): p. 22920-22931.
187. Venkatesan, P., *Preliminary phase 1 results from an HIV vaccine candidate trial*. The Lancet, 2021. **2**(3).
188. Sheridan, C., *First COVID-19 DNA vaccine approved, others in hot pursuit*. Nat Biotechnol, 2021. **39**(12): p. 1479-1482.
189. Hobernik, D. and M. Bros, *DNA Vaccines-How Far From Clinical Use?* Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
190. Bode, C., et al., *CpG DNA as a vaccine adjuvant*. Expert Rev Vaccines, 2011. **10**(4): p. 499-511.
191. Krohn, K., et al., *A DNA HIV-1 vaccine based on a fusion gene expressing non-structural and structural genes of consensus sequence of the A-C subtypes and the ancestor sequence of the F-H subtypes. Preclinical and clinical studies*. Microbes Infect, 2005. **7**(14): p. 1405-13.
192. MacGregor, R.R., et al., *First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response*. J Infect Dis, 1998. **178**(1): p. 92-100.
193. Excler, J.L. and J.H. Kim, *Novel prime-boost vaccine strategies against HIV-1*. Expert Rev Vaccines, 2019. **18**(8): p. 765-779.
194. McBride, A.A., *The papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 57-79.
195. Blazevic, V., et al., *Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with a novel gene transport unit (GTU)-MultiHIV DNA vaccine*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(7): p. 667-77.
196. Zhou, J., et al., *PD1-based DNA vaccine amplifies HIV-1 GAG-specific CD8+ T cells in mice*. J Clin Invest, 2013. **123**(6): p. 2629-42.
197. De Rosa, S.C., et al., *Robust antibody and cellular responses induced by DNA-only vaccination for HIV*. JCI Insight, 2020. **5**(13).
198. Adam, L., et al., *Innate Molecular and Cellular Signature in the Skin Preceding Long-Lasting T Cell Responses after Electroporated DNA Vaccination*. J Immunol, 2020. **204**(12): p. 3375-3388.
199. Edupuganti, S., et al., *Intramuscular and Intradermal Electroporation of HIV-1 PENNVAX-GP((R)) DNA Vaccine and IL-12 Is Safe, Tolerable, Acceptable in Healthy Adults*. Vaccines (Basel), 2020. **8**(4).
200. Lisziewicz, J., et al., *DermaVir: a novel topical vaccine for HIV/AIDS*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(1): p. 160-9.

201. Porgador, A., et al., *Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1075-82.
202. Rodriguez, B., et al., *Safety, tolerability, and immunogenicity of repeated doses of dermavir, a candidate therapeutic HIV vaccine, in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: results of the ACTG 5176 trial*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **64**(4): p. 351-9.
203. Lori, F., et al., *DermaVir, a novel HIV immunisation technology*. Vaccine, 2005. **23**(17-18): p. 2030-4.
204. Lisziewicz, J., et al., *Single DermaVir immunization: dose-dependent expansion of precursor/memory T cells against all HIV antigens in HIV-1 infected individuals*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35416.
205. Lori, F., *DermaVir: a plasmid DNA-based nanomedicine therapeutic vaccine for the treatment of HIV/AIDS*. Expert Rev Vaccines, 2011. **10**(10): p. 1371-84.
206. Barre-Sinoussi, F. and X. Montagnon, *Animal models are essential to biological research: issues and perspectives*. Future Sci OA, 2015. **1**(4): p. FSO63.
207. Yong, K.S.M., Z. Her, and Q. Chen, *Humanized Mice as Unique Tools for Human-Specific Studies*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018. **66**(4): p. 245-266.
208. Whitney, J.B. and R. Brad Jones, *In Vitro and In Vivo Models of HIV Latency*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1075**: p. 241-263.
209. Sharp, P.M., G.M. Shaw, and B.H. Hahn, *Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3891-902.
210. Policicchio, B.B., I. Pandrea, and C. Apetrei, *Animal Models for HIV Cure Research*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 12.
211. Shedlock, D.J., G. Silvestri, and D.B. Weiner, *Monkeying around with HIV vaccines: using rhesus macaques to define 'gatekeepers' for clinical trials*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 717-28.
212. Chahroudi, A., G. Silvestri, and M. Lichterfeld, *T memory stem cells and HIV: a long-term relationship*. Curr HIV/AIDS Rep, 2015. **12**(1): p. 33-40.
213. Zhang, Z.Q., et al., *Mamu-A*01 allele-mediated attenuation of disease progression in simian-human immunodeficiency virus infection*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 12845-54.
214. O'Connor, D.H., et al., *Major histocompatibility complex class I alleles associated with slow simian immunodeficiency virus disease progression bind epitopes recognized by dominant acute-phase cytotoxic-T-lymphocyte responses*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 9029-40.
215. Pitisuttithum, P., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand*. J Infect Dis, 2006. **194**(12): p. 1661-71.
216. Rob Camp, R.J., Tracy Swan & Javid Syed *What's in the Pipeline: New HIV Drugs, Vaccines, Microbicides, HCV and TB Treatments in Clinical Trials*. , B. Huff, Editor 2005.
217. Buchbinder, S.P., et al., *Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial*. Lancet, 2008. **372**(9653): p. 1881-1893.
218. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-20.
219. Susan Zolla-Pazner, N.L.M., Jerome H Kim, *A tale of four studies: HIV vaccine immunogenicity and efficacy in clinical trials*. The Lancet HIV, 2021. **8**(7): p. E449-E452.
220. Lawrence Corey, M.J.M., *HIV vaccines: mosaic approach to virus diversity*. Nature medicine, 2010. **16**: p. 268-270.

221. Dan H. Barouch, F.L.T., Frank Wegmann, Daniel J. Stieh, Galit Alter, Merlin L. Robb, Nelson L. Michael, Lauren Peter, Joseph P. Nkolola, Erica N. Borducchi, Abishek Chandrashekar, David Jetton, Kathryn E. Stephenson, Wenjun Li, Bette Korber, Georgia D. Tomaras, David C. Montefiori, Glenda Gray, Nicole Frahm, M. Juliana McElrath, Lindsey Baden, Jennifer Johnson, Julia Hutter, Edith Swann, Etienne Karita, Hannah Kibuuka, Juliet Mpendo, Nigel Garrett, Kathy Mngadi, Kundai Chinyenze, Frances Priddy, Erica Lazarus, Fatima Laher, Sorachai Nitayapan, Punnee Pittisuttithum, Stephan Bart, Thomas Campbell, Robert Feldman, Gregg Lucksinger, Caroline Borremans, Katleen Callewaert, Raphaela Roten, Jerald Sadoff, Lorenz Scheppeler, Mo Weijtens, Karin Feddes-de Boer, Daniëlle van Manen, Jessica Vreugdenhil, Roland Zahn, Ludo Lavreys, Steven Nijs, Jeroen Tolboom, Jenny Hendriks, Zelda Euler, Maria G. Pau, and Hanneke Schuitemaker, *Evaluation of a Mosaic HIV-1 Vaccine in a Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Phase I/IIa Clinical Trial and in Rhesus Monkeys*. *Lancet*, 2019: p. 232-243.
222. Pitisuttithum, P. and M.A. Marovich, *Prophylactic HIV vaccine: vaccine regimens in clinical trials and potential challenges*. *Expert Rev Vaccines*, 2020. **19**(2): p. 133-142.
223. Lindsey R Baden, D.J.S., Michal Sarnecki, Stephen R Walsh, Georgia D Tomaras, James G Kublin, Juliana Mc Elrath, Galit Alter, Guido Ferrar,i David Montefiori, Philipp Mann, Steven Nijs, Katleen Callewaert , Paul Goepfert, Srilatha Edupuganti, Etienne Karita, Johannes P Langedijk, Frank Wegmann,...Hong Van Ti, *Safety and immunogenicity of two heterologous HIV vaccine regimens in healthy, HIV-uninfected adults (TRAVERSE): a randomised, parallel-group, placebo-controlled, double-blind, phase 1/2a study*. *The Lancet HIV*, 2020. **7**(10): p. e688-e698.
224. Mega, E.R., *'Mosaic' HIV vaccine to be tested in thousands of people across the world*. *Nature*, 2019. **572**(7768): p. 165-166.
225. Schijns, V.E. and E.C. Lavelle, *Trends in vaccine adjuvants*. *Expert Rev Vaccines*, 2011. **10**(4): p. 539-50.
226. Jain, S., D.T. O'Hagan, and M. Singh, *The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant*. *Expert Rev Vaccines*, 2011. **10**(12): p. 1731-42.
227. Chuang, S.C., et al., *Induction of long-lasting protective immunity against Toxoplasma gondii in BALB/c mice by recombinant surface antigen 1 protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles*. *Parasit Vectors*, 2013. **6**: p. 34.
228. Helson, R., et al., *Poly(lactide-co-glycolide) (PLG) microparticles modify the immune response to DNA vaccination*. *Vaccine*, 2008. **26**(6): p. 753-61.
229. Tomljenovic, L. and C.A. Shaw, *Aluminum vaccine adjuvants: are they safe?* *Curr Med Chem*, 2011. **18**(17): p. 2630-7.
230. Sun, B., et al., *Polysaccharides as vaccine adjuvants*. *Vaccine*, 2018. **36**(35): p. 5226-5234.
231. Cao, W., et al., *Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant*. *Acta Biomater*, 2020. **112**: p. 14-28.
232. Cui, B., et al., *Flagellin as a vaccine adjuvant*. *Expert Rev Vaccines*, 2018. **17**(4): p. 335-349.
233. Mackall, C.L., T.J. Fry, and R.E. Gress, *Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(5): p. 330-42.
234. Huang, W. and A. August, *The signaling symphony: T cell receptor tunes cytokine-mediated T cell differentiation*. *J Leukoc Biol*, 2015. **97**(3): p. 477-85.
235. Rosenberg, S.A., et al., *IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells*. *J Immunother*, 2006. **29**(3): p. 313-9.
236. Melchionda, F., et al., *Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1177-87.

237. Toe, J.G., M. Pellegrini, and T.W. Mak, *Promoting immunity during chronic infection--the therapeutic potential of common gamma-chain cytokines*. *Mol Immunol*, 2013. **56**(1-2): p. 38-47.
238. van Roon, J.A., et al., *Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(6): p. 1700-10.
239. Gregory, S.G., et al., *Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis*. *Nat Genet*, 2007. **39**(9): p. 1083-91.
240. Hryniewicz, A., et al., *Interleukin-15 but not interleukin-7 abrogates vaccine-induced decrease in virus level in simian immunodeficiency virus mac251-infected macaques*. *J Immunol*, 2007. **178**(6): p. 3492-504.
241. Stevceva, L., M. Moniuszko, and M.G. Ferrari, *Utilizing IL-12, IL-15 and IL-7 as Mucosal Vaccine Adjuvants*. *Lett Drug Des Discov*, 2006. **3**(8): p. 586-592.
242. Mishra, A., L. Sullivan, and M.A. Caligiuri, *Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(8): p. 2044-50.
243. Prlic, M., L. Lefrancois, and S.C. Jameson, *Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15*. *J Exp Med*, 2002. **195**(12): p. F49-52.
244. Lori, F., et al., *Cytokine-adjuvanted HIV-DNA vaccination strategies*. *Springer Semin Immunopathol*, 2006. **28**(3): p. 231-8.
245. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 6571-6.
246. Nanjappa, S.G., et al., *Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(3): p. 1027-39.
247. Pellegrini, M., et al., *Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies*. *Nat Med*, 2009. **15**(5): p. 528-36.
248. Calarota, S.A., et al., *IL-15 as memory T-cell adjuvant for topical HIV-1 DermaVir vaccine*. *Vaccine*, 2008. **26**(40): p. 5188-95.
249. Bhadra, R., H. Guan, and I.A. Khan, *Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 T cell response against Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10842.
250. Lugli, E., et al., *IL-15 delays suppression and fails to promote immune reconstitution in virally suppressed chronically SIV-infected macaques*. *Blood*, 2011. **118**(9): p. 2520-9.
251. Vandergeeten, C., R. Fromentin, and N. Chomont, *The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012. **23**(4-5): p. 143-9.
252. Pilipow, K., et al., *IL15 and T-cell Stemness in T-cell-Based Cancer Immunotherapy*. *Cancer Res*, 2015. **75**(24): p. 5187-5193.
253. Xu, X., et al., *Newcastle disease virus co-expressing interleukin 7 and interleukin 15 modified tumor cells as a vaccine for cancer immunotherapy*. *Cancer Sci*, 2018. **109**(2): p. 279-288.
254. Whitney, J.B. and R.M. Ruprecht, *Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects*. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. **17**(1): p. 17-26.
255. !!! INVALID CITATION !!!
256. Antia, A., et al., *Heterogeneity and longevity of antibody memory to viruses and vaccines*. *PLoS Biol*, 2018. **16**(8): p. e2006601.
257. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2205-13.
258. Wherry, E.J. and R. Ahmed, *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. *J Virol*, 2004. **78**(11): p. 5535-45.

259. Radziewicz, H., et al., *Memory CD8+ T cell differentiation in viral infection: a cell for all seasons*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(36): p. 4848-57.
260. Gattinoni, L., et al., *T memory stem cells in health and disease*. Nat Med, 2017. **23**(1): p. 18-27.
261. Costa Del Amo, P., et al., *Human TSCM cell dynamics in vivo are compatible with long-lived immunological memory and stemness*. PLoS Biol, 2018. **16**(6): p. e2005523.
262. Reiner, S.L. and W.C. Adams, *Lymphocyte fate specification as a deterministic but highly plastic process*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(10): p. 699-704.
263. Nolz, J.C. and J.T. Harty, *Protective capacity of memory CD8+ T cells is dictated by antigen exposure history and nature of the infection*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 781-93.
264. Graef, P., et al., *Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 116-26.
265. Schmueck-Henneresse, M., et al., *Peripheral blood-derived virus-specific memory stem T cells mature to functional effector memory subsets with self-renewal potency*. J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5559-67.
266. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naive-like profile upon yellow fever vaccination*. Sci Transl Med, 2015. **7**(282): p. 282ra48.
267. Li, G., C. Teleki, and T. Wang, *Memory T Cells in Flavivirus Vaccination*. Vaccines (Basel), 2018. **6**(4).
268. Miller, J.D., et al., *Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 710-22.
269. Wahid, R., M.J. Cannon, and M. Chow, *Virus-specific CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell responses and long-term T-cell memory in individuals vaccinated against polio*. J Virol, 2005. **79**(10): p. 5988-95.
270. Cecilia S. Lindestam Arlehamn, A.G., Federico Mele, Ryan Henderson, Justine Swann, Jason A. Greenbaum, Yohan Kim, John Sidney, Eddie A. James, Randy Taplitz, Denise M. McKinney, William W. Kwok, Howard Grey, Federica Sallusto, Bjoern Peters, Alessandro Sette, *Memory T Cells in Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Are Directed against Three Antigenic Islands and Largely Contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 Subset*. PLOS Pathogens, 2013. **9**(1): p. 1-16.
271. Lindestam Arlehamn, C.S., et al., *Memory T cells in latent Mycobacterium tuberculosis infection are directed against three antigenic islands and largely contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 subset*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003130.
272. Axelsson-Robertson, R., et al., *Mycobacterium tuberculosis-specific and MHC class I-restricted CD8+ T-cells exhibit a stem cell precursor-like phenotype in patients with active pulmonary tuberculosis*. Int J Infect Dis, 2015. **32**: p. 13-22.
273. Mpande, C.A.M., et al., *Functional, Antigen-Specific Stem Cell Memory (TSCM) CD4(+) T Cells Are Induced by Human Mycobacterium tuberculosis Infection*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 324.
274. Yuan, J., et al., *A Subset of Mycobacteria-Specific CD4(+) IFN-gamma(+) T Cell Expressing Naive Phenotype Confers Protection against Tuberculosis Infection in the Lung*. J Immunol, 2019. **203**(4): p. 972-980.
275. Cassaniti, I., et al., *Memory T cells specific for HBV enumerated by a peptide-based cultured enzyme-linked immunospot assay in healthy HBV-vaccinated subjects*. Hum Vaccin Immunother, 2016. **12**(11): p. 2927-2933.
276. Sckisel, G.D., et al., *Influenza infection results in local expansion of memory CD8(+) T cells with antigen non-specific phenotype and function*. Clin Exp Immunol, 2014. **175**(1): p. 79-91.
277. Swain, S.L., R.W. Dutton, and D.L. Woodland, *T cell responses to influenza virus infection: effector and memory cells*. Viral Immunol, 2004. **17**(2): p. 197-209.

278. Spitaels, J., K. Roose, and X. Saelens, *Influenza and Memory T Cells: How to Awake the Force*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
279. Calarota, S.A., et al., *HIV-1-specific T cell precursors with high proliferative capacity correlate with low viremia and high CD4 counts in untreated individuals*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5907-15.
280. Ribeiro, S.P., et al., *The CD8(+) memory stem T cell (T(SCM)) subset is associated with improved prognosis in chronic HIV-1 infection*. J Virol, 2014. **88**(23): p. 13836-44.
281. Miller, J.D.e.a., *Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 710-722.
282. Hammarlund, E.e.a., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nat. Med, 2003. **9**: p. 1131-1137.
283. Good, Z., et al., *Proliferation tracing with single-cell mass cytometry optimizes generation of stem cell memory-like T cells*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(3): p. 259-266.
284. Axelsson-Robertson, R., Ju, J.H., Kim, H.Y., Zumla, A. & Maeurer M. *Mycobacterium tuberculosis-specific and MHC class I-restricted CD8+ T-cells exhibit a stem cell precursor-like phenotype in patients with active pulmonary tuberculosis*. Int. J. Infect. Dis. , 2015 **32**: p. 13-22.
285. Yahia Chebloune, M., Géraldine Arrode-Brusés, Corinne Ronfort, Deepanwita Bosea, Jean Gagnon, Sanjeev Gumberb, Tara Villinger, Siddappa N. Byrareddy, Pamela A. Kozlowski, Leslie Gosse, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Roger Le Gr and François Villinger, *A single lentivector DNA based immunization contains a late heterologous SIVmac251 mucosal challenge infection*. Vaccine, ELSEVIER, 2020. **38**(21): p. 3729-3739.
286. Sandra A. Calarota, A.F., Renato Maserati, Fausto Baldanti, Stefania Paolucci, Mary A. Young, Christos M. Tsoukas, Julianna Lisziewicz and Franco Lori, *HIV-1-Specific T Cell Precursors with High Proliferative Capacity Correlate with Low Viremia and High CD4 Counts in Untreated Individuals*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(9): p. 5907-5915.
287. Géraldine Arrode-Brusés, M.M., Monique Baccard-Longere, François Villinger, and Yahia Chebloune, *Long-Term Central and Effector SHIV-Specific Memory T Cell Responses Elicited after a Single Immunization with a Novel Lentivector DNA Vaccine*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110883.
288. Ely, K.H., et al., *Nonspecific recruitment of memory CD8+ T cells to the lung airways during respiratory virus infections*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1423-9.
289. Bonnie van Wilgenburg, L.L., Zhenjun Chen, Troi J. Pediongco, Huimeng Wang, Mai Shi, Zhe Zhao, Marios Koutsakos, Simone Nüssing, Sneha Sant, Zhongfang Wang, Criselle D'Souza, Xiaoxiao Jia, Catarina F. Almeida, Lyudmila Kostenko, Sidonia B. G. Eckle, Bronwyn S. Meehan, Axel Kallies, Dale I. Godfrey, Patrick C. Reading, Alexandra J. Corbett, James McCluskey, Paul Klenerman, Katherine Kedzierska & Timothy S. C. Hinks *MAIT cells contribute to protection against lethal influenza infection in vivo*. Nat. Commun., 2018. **9**: p. 4706.
290. Talyn Chu, A.J.T., Sarah Roepke, Amy M Berkley, Amanda Woodward-Davis, Laura Pattacini, Michael J Bevan, Dietmar Zehn, Martin Prlic, *Bystander-activated memory CD8+ T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner*. Cell Rep, 2013. **3**: p. 701-708.
291. Li, M., et al., *Age related human T cell subset evolution and senescence*. Immun Ageing, 2019. **16**: p. 24.
292. Guo, Y., et al., *Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent*. Cytokine Growth Factor Rev, 2017. **38**: p. 10-21.